

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND. PHARM.

**SELEKTIV VÆSKEFASEMIKROEKSTRAKSJON AV
NEUROTENSIN OG METABOLITTENE I VANN OG
BIOLOGISKE VÆSKER**

HÅVARD LOFTHEIM



**Kjemisk seksjon,
Farmasøytisk Institutt,
Matematisk-naturvitenskapelig fakultet,
Universitetet i Oslo
Høsten 2004**

**SELEKTIV VÆSKEFASEMIKROEKSTRAKSJON AV
NEUROTENSIN OG METABOLITTENE I VANN OG
BIOLOGISKE VÆSKER**

HÅVARD LOFTHEIM

Arbeidet ble utført i tidsrommet november 2003 til oktober 2004 ved Kjemisk seksjon, gruppe for legemiddelanalyse, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Veileder:

1. amanuensis dr. Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

FORORD

Jeg vil rette en stor takk til min veileder 1. amanuensis dr. Léon Reubsæet for svært god veiledning og opplæring. Reubsæet har vært tilgjengelig hele året og vært til uvurderlig hjelp både på laboratoriet og under skrivingen. Samtidig har han gitt frihet til å kunne utforme oppgaven på egen hånd.

Videre vil jeg takke alle på Avdeling for legemiddelanalyse, inkludert hovedfagstudentene Astrid og Sverre, for et sosialt og inkluderende miljø som har bidratt til å gjøre hovedfagsåret til en trivelig og lærerik tid. Jeg vil også takke Astrid for et godt samarbeid på laboratoriet den første delen av hovedfagsåret.

Til slutt vil jeg takke Ragna for oppmuntrende ord og støtte.

Oslo, oktober 2004

Håvard Loftheim

INNHALDSFORTEGNELSE

1	SAMMENDRAG	4
2	FORKORTELSER	5
3	INNLEDNING	7
3.1	BAKGRUNN	7
3.2	HENSIKT	8
4	TEORI	9
4.1	PEPTIDER	9
4.1.1	Membranbasert ekstraksjon av peptider	12
4.2	VÆSKEFASEMIKROEKSTRAKSJON, LPME	13
4.3	VÆSKEKROMATOGRAFI, HPLC	15
4.4	LC-MS	16
5	EKSPERIMENTELT	19
5.1	KARAKTERISTIKK AV PEPTIDER	19
5.2	PEPTIDER, KJEMIKALIER OG UTSTYR	20
5.3	TILLAGING AV LØSNINGER OG BUFFERE	23
5.3.1	Peptider	23
5.3.2	LPME	23
5.3.3	Prøveopparbeidelse i urin	30
5.3.4	Prøveopparbeidelse før LC-MS	31
5.3.5	Mobilfaser til kromatografi	31
5.4	METODER OG PROSEDYRER	32
5.4.1	Prøveopparbeidelse (LPME)	32
5.4.2	HPLC-metode	33
5.4.3	Partiell validering	35
5.4.4	LC-MS	36
5.4.5	Beregning av utbytte og oppkonsentreringsfaktor	37
6	RESULTATER OG DISKUSJON	38
6.1	METODE FOR ANALYSE AV PEPTIDER	38
6.1.1	Partiell validering	39
6.2	PRØVEOPPARBEIDELSE (LPME)	43
6.2.1	Endringer foretatt i donorfase	44
6.2.2	Endringer foretatt i organisk fase	54
6.2.3	Endringer foretatt i akseptorfase	56
6.2.4	Prøveopparbeidelse i urin	61
6.3	LC-MS	63
6.3.1	Metode for analyse av peptider	63
6.3.2	Prøveopparbeidelse (LPME) i vann og urin før analyse på LC-MS	67
7	KONKLUSJON	70
8	REFERANSELISTE	72

1 SAMMENDRAG

Neurotensin (NT), NT 1-6 og NT 1-8 ble brukt som modellpeptider for å undersøke hvilke egenskaper peptider har i væskefasemikroekstraksjon (LPME). Til analyse av ekstraktene har det blitt utviklet en HPLC-metode. Kolonnen som ble brukt var ChromSep HPLC 50×2 mm Inertsil® ODS. For å separere peptidene ble gradienteluering brukt med mobilfaser sammensatt av acetonitril (ACN), maursyre, 1-heptansulfonsyre og vann.

Peptidene ble ved hjelp av LPME ekstrahert fra vandige prøver gjennom en porøs hulfiber impregnert med organisk løsningsmiddel og inn i en 20 µl sur vandig akseptorfase i fiberens hulrom. Volumet av donorfasen ble variert mellom 0,2 ml og 1,5 ml. Ulike organiske faser ble utprøvd, men 1-oktanol viste seg best egnet. pH-verdien i donorfasen ble variert mellom 1,2 og 7,8 ved hjelp av HCl-løsninger og buffere. Donorfaser med pH 2 og 3 fungerte best avhengig av hvilken akseptorfase som ble brukt. Sulfonsyrer ble brukt som ionpardanner i donorfasen. Flere kjedelengder fra C₆ til C₉ til ble prøvd og 1-oktansulfonsyre gav best ekstraksjonsutbytte for alle peptidene. Surheten av akseptorfase ble variert mellom pH 0 og 4,06. Akseptorfase med pH 0,77 gav best ekstraksjonsutbytte og en forskjell i protonkonsentrasjon mellom akseptor- og donorfase var essensielt for en vellykket ekstraksjon. Tilsetning av positive ioner til akseptorfase i et system uten forskjell i H⁺-konsentrasjon gav også økte ekstraksjonsutbytter. Ekstraksjonsutbytte på 57 % ble oppnådd for neurotensin og 8 % for NT 1-8. God selektivitet ble oppnådd ved å variere pH i donorfase. NT 1-6 ble ikke ekstrahert i særlig grad da den var for hydrofil.

Ekstraksjoner av peptider i urin ble forsøkt. Urin ble fortynnet med donorfase før ekstraksjon på grunn av saltinnholdet. NT 1-8 ble ekstrahert fra urin med ekstraksjonsutbytter mellom 8 % og 12 %. Ekstraksjonsutbytter av neurotensin og NT 1-6 ble ikke oppnådd fra urin.

For å oppnå lavere deteksjonsgrenser ble det utviklet en LC-MS-metode. Nedre deteksjonsgrense (S/N=3) ble beregnet til 1,2 ng/ml for neurotensin, 0,5 ng/ml og 1,0 ng/ml for henholdsvis NT 1-8 og NT 1-6. Akseptorfaser fra ekstraksjon av urin og vann ble analysert med LC-MS og viste ekstraksjonsutbytter i samme størrelseforhold som ved HPLC-analyse.

2 FORKORTELSER

ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
APCI	Atomic Pressure Chemical Ionisation
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
C ₈ H ₂₀ NBr	Tetraetylammoniumbromid
CaCl ₂	Kalsiumklorid
CH ₃ COOH	Eddiksyre
D2EHPA	Di(2-ethylhexyl)fosfor syre
ESI	Elektrospray Ionisering
Glu	Glutamat
H ₂ O	Vann
HCl	Saltsyre
HCOOH	Maursyre
HPLC	Væskekromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
Ile	Isoleucin
kV	Kilovolt
LC	Væskekromatografi (Liquid Chromatography)
Leu	Leucin
Li ₂ SO ₄	Litiumsulfat
Lys	Lysin
LPME	Væskefasemikroekstraksjon (Liquid Phase Micro Extraction)
NT	Neurotensin
MS	Massespektrometri (Mass Spectrometry)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenfosfat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenfosfat
NaOH	Natriumhydroksid
NH ₄ Cl	Ammoniumklorid
pGlu	Pyroglutamat
Phe	Fenylalanin
Pro	Prolin

rpm	Runder per minutt
RSD	Relativt standardavvik
S/N	Signal/Støy
SIM	Selected Ion Monitoring
SLM	Supported Liquid Membranes
Tyr	Tyrosin
UV	Ultrafiolett

3 INNLEDNING

3.1 BAKGRUNN

Prøveopparbeidelse og analyse av biologiske aktive peptider er og vil være et meget viktig felt i fremtiden. Peptider kan fungere som verktøy for å diagnostisere sykdom hos pasienter i form av for eksempel biomarkører. Peptider er molekyler sammensatt av 20 ulike aminosyrer ved hjelp av peptidbindinger. Dette medfører at hvert enkelt peptid ofte har svært ulike karakteristika. Størrelsen kan variere fra dipeptider sammensatt av 2 aminosyrer til proteiner sammensatt av flere tusen aminosyrer. Aminosyrer har viktige funksjoner flere plasser i naturen og deltar blant annet i en mengde metabolske prosesser og som signalmolekyler. Et eksempel er hormonet insulin. Dette peptidet består av to polypeptidkjeder på henholdsvis 30 og 21 aminosyrer. Et annet eksempel på biologiske aktive peptider er enkephalinene. Dette er korte peptider produsert i sentralnervesystemet som binder til reseptorer i hjernen og gir smertelindring[1].

For å studere små mengder peptider i biologiske materialer, er det helt nødvendig med en selektiv analysemetode. Selektivitet kan oppnås i deteksjon ved bruk av for eksempel MS, eller i prøveopparbeidelse. Væskefasemikroekstraksjon (LPME) er et relativt nytt membransystem[2], og har tidligere vist seg å være et kraftig verktøy til prøveopparbeidelse og opprensing av legemidler i biologiske matrikser som plasma[3, 4] og urin[5]. Ved trefase LPME blir analytter ekstrahert over fra en prøve gjennom en porøs hulfiber impregnert med et organisk løsningsmiddel og inn i en vandig akseptorfase på innsiden av fiberen. Til bruk i prøveopparbeidelse har LPME flere fordeler. Siden volumforskjellen mellom donorfase (0,2 - 4,0 ml) og akseptorfase (20 µl) er stor, er det mulighet for oppkonsentrering av analytten. Dette er viktig ved analyse av biologiske væsker der analyttene ofte foreligger i lave konsentrasjoner. Trefase systemet gir også god opprensing fra biologiske prøver, da den organiske fasen fungerer som en barriere mellom de to vandige fasene. Akseptorfasen er vandig og kan derfor injiseres direkte i HPLC.

Mye av forskning som er gjort med LPME, er utført med tradisjonelle legemidler som analytter. Men nylig har det lyktes å ekstrahere små tripeptider over membranen i et trefase LPME-system[6]. Disse syntetiske modellpeptidene viser hvordan variasjoner i struktur påvirker peptidenes oppførsel i LPME-systemet. For å kunne utvikle en effektiv

prøveopparbeidelsemetode for peptider i biologiske væsker ved hjelp av LPME, er det nødvendig å gjøre grunnleggende undersøkelser på hvilke egenskaper peptidene har i LPME-systemet og hvordan ulike faktorer påvirker ekstraksjonsutbyttet. Det er derfor naturlig å ta utgangspunkt i litt større peptider som finnes endogent og har en funksjon i kroppen. Neurotensin er et slikt peptid som består 13 aminosyrer og finnes flere steder i menneskekroppen. Peptidet har i tillegg flere metabolitter som er bygd opp av de samme aminosyrene, men består av kortere kjeder.

3.2 HENSIKT

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke videre hvordan peptider oppfører seg i LPME-systemet med utgangspunkt i opparbeidet kunnskap ved forsøk gjort med tripeptider. Neurotensin og metabolittene NT 1-6 og NT 1-8 ble benyttet som modellpeptider. Forskjeller i kjemisk struktur av de valgte peptidene ble brukt til å belyse grunnleggende prinsipper om peptider i et trefase system. Målet var å kunne opparbeide nok kunnskap til utføre selektive ekstraksjoner i biologiske væsker. Til analyse av ekstraktene fra LPME, må det også utvikles en HPLC-metode. For å analysere peptider i biologiske væsker er det nødvendig å utvikle en mer følsom analysemetode på grunn av lave konsentrasjoner. Det er derfor ønskelig å utvikle en LC-MS metode for å oppnå tilstrekkelig lav deteksjonsgrense.

4 TEORI

4.1 PEPTIDER

Peptider er molekyler som er sammensatt av aminosyrer. Det finnes naturlig 20 ulike aminosyrer som kan inngå som byggesteiner i et peptid. Alle 20 aminosyrene har en karboksylgruppe og en aminogruppe bundet til det samme karbonatomet, α -karbonet. Karboksylgruppen har en pK_a -verdi (pK_1) på mellom 1,8 og 2,4 avhengig av sidekjeden til aminosyren. pK_a -verdien til aminogruppen (pK_2) ligger i de fleste tilfeller mellom 9 og 10. Sidekjedene til aminosyrene er forskjellige. De varierer med tanke på struktur, størrelse og ladning, og gir dermed aminosyrene ulike egenskaper. Har aminosyren sidegrupper med basiske eller sure egenskaper blir pK_a -verdien til denne gruppen omtalt som pK_R . Sidegruppene varierer fra å være helt upolare og uløselige i vann, til svært polare og hydrofile. Aminosyrene blir ofte klassifisert på grunnlag av disse egenskapene. Ladningene til karboksyl- og aminogruppen fører til at peptidene får egenskaper som zwitterioner. Peptidet får derfor dipolare egenskaper som er viktige å ta hensyn til ved prøveoppbevaring.

Neurotensin er et peptid bestående av 13 aminosyrer. Peptidet ble første gang isolert fra hypothalamus fra storfe i 1973[7]. Navnet ble valgt på grunnlag av peptidets lokalisering i nervesystemet, samt evnen til å gi vasodilatasjon ved lokal administrering. Det er nå kjent at neurotensin både fungerer som neurotransmittor i sentralnervesystemet og som neuromodulator i perifere vev. Dette er hovedsakelig i det gastrointestinale systemet, der peptidet kan regnes som et hormon[8]. Neurotensin blir metabolisert i hjernen og tarmen[9], i plasma via enzym fra leveren[10] og av nyrene[11]. Neurotensin finnes ikke intakt i urin. Flere av metabolittene er derimot mer hydrofile og vil kunne påvises i urin[11]. En av disse metabolittene er Neurotensin 1-8 som i tillegg finnes i plasma[12]. Det er også utviklet flere metoder for å analysere neurotensin i plasma[13, 14]. Felles for disse er høy følsomhet, noe som er nødvendig da konsentrasjonen av neurotensin i plasma er lav. Analyser har vist at konsentrasjonen hos friske voksne personer ligger mellom 10-20 pg/ml[15, 16].

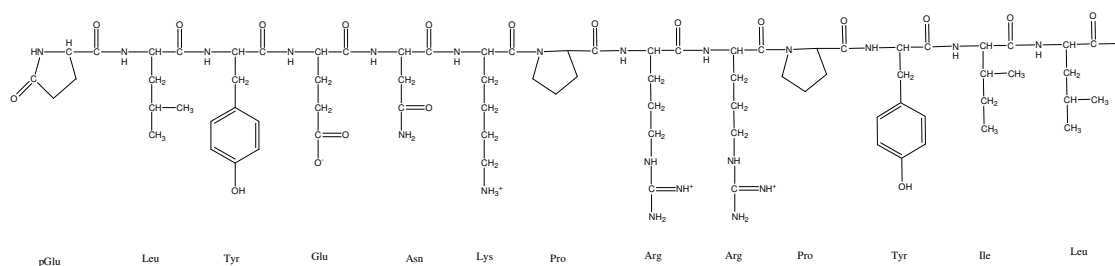
Analyttene som ble brukt i oppgaven var 3 peptider. De er bygd opp av et ulikt antall aminosyrer med varierende hydrofobisitet og ulike egenskaper til sidegruppene. Neurotensin er det største av peptidene og finnes endogent[8]. De to andre peptidene er metabolitter av neurotensin og er bygd opp rundt den samme aminosyrestrukturen. Metabolittene er kortere

kjeder og er kuttet på ulike plasser fra den terminale karboksylgruppen. Alle 3 peptidene har flere konjugerte dobbeltbindinger, inkludert aromater, og kan derfor lett detekteres ved hjelp av en UV-detektor.

NEUROTENSIN

pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu

Neurotensin består av 13 aminosyrer. Den terminale aminogruppen til neurotensin er uladet. Dette er fordi pyroGlutamat (pGlu) danner en ringstruktur ved at karboksylgruppen binder til α -aminogruppen. Sidekjeden blir derfor uladet, men polar. Lys og Arg har basiske egenskaper i sidekjedene. Med pK_a -verdier over 10 (se tabell 5-2 for pK_a -verdier) vil gruppene være positivt ladet ved fysiologisk pH. Ved lav pH (som under LPME og HPLC eksperimenter) har neurotensin 3 positive ladninger og kan binde 3 molekyler av ionpaddanner til hvert peptidmolekyl. Ved basisk pH kan neurotensin ha inntil 4 negative ladninger. 4 av de 13 aminosyrene er upolare (se tabell 5-3), dette i kombinasjon med størrelsen (se tabell 5-1) gjør til at neurotensin er det mest hydrofobe av de tre peptidene. Figur 4-1 viser den molekylære strukturen med ladninger ved pH 7.



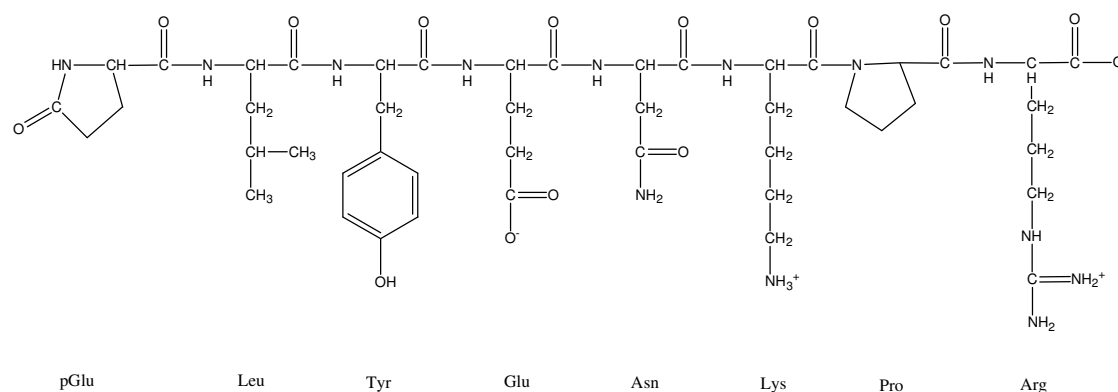
Figur 4-1 Strukturformel for Neurotensin ved pH 7.

NEUROTENSIN 1-8

pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg

Neurotensin 1-8 består av 8 aminosyrer. Dette er den samme sekvensen som de 8 første aminosyrene til neurotensin, talt fra aminoterminalen. På samme måte som neurotensin har derfor NT 1-8 også en terminal aminogruppe uten ladning. Med en Lys og Arg kan dette peptidet ha maksimalt 2 positive ladninger (se tabell 5-2 for pK_a -verdier) ved lav pH (som

under LPME og HPLC eksperimenter). Hvert molekyl kan derfor binde til 2 molekyler av en negative ionpardanner. Neurotensin 1-8 kan maksimalt ha 3 negative ladninger ved basisk pH. NT 1-8 er langt mer hydrofil ved fysiologisk pH enn neurotensin på tross av færre ladninger. Bare 2 av aminosyrene, Leu og Pro, er upolare (se tabell 5-3 for log P-verdier). Figur 4-2 viser den molekylære strukturen til NT 1-8 med ladninger ved pH 7.

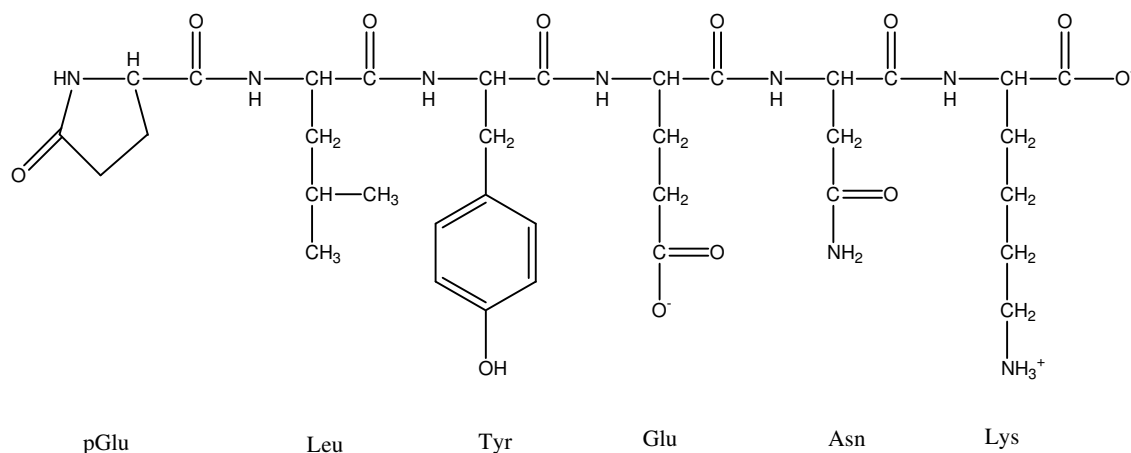


Figur 4-2 Strukturformel for Neurotensin 1-8 ved pH 7.

NEUROTENSIN 1-6

pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys

Neurotensin 1-6 er det minste av de tre peptidene bestående av 6 aminosyrer. Aminosyresekvensen er den samme som de 6 første til neurotensin, talt fra aminoterminalen. pGlu er den første aminosyren og medfører at den terminale aminogruppen er uladet. NT 1-6 har bare Lys som er positivt ladet og kan ved lav pH dermed bare binde til 1 molekyl med ionpardanner (se tabell 5-2 for pK_a -verdier). Ved basisk pH kan NT 1-6 ha 3 negative ladninger. Leu er den eneste upolare aminosyren med log P-verdi på -1,61 (se tabell 5-3). NT 1-6 er i tillegg det korteste peptidet og vil derfor ha mye høyere affinitet for vandige løsninger enn for organiske løsningsmidler. Figur 4-3 viser den molekylære strukturen til NT 1-6 med ladninger ved pH 7.



Figur 4-3 Strukturformel for Neurotensin 1-6 pH 7.

4.1.1 Membranbasert ekstraksjon av peptider

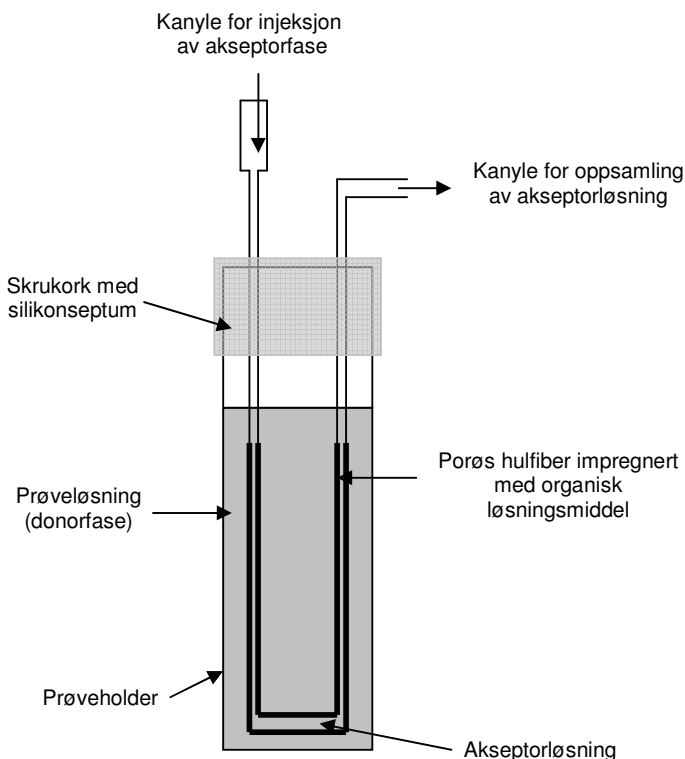
For å studere små mengder peptider i biologiske materialer, er det helt nødvendig med en selektiv prøveopparbeidelse. Det finnes mange publikasjoner som beskriver konvensjonelle metoder for å opparbeide peptider fra biologiske væsker[17-19]. Metodene er gjerne tidkrevende og lite selektive, samtidig som de gir lite oppkonsentrering. I den senere tid har supported liquid membranes (SLM) blitt prøvd ut til ekstraksjon og separasjon. Dette er et trefase system, der to vandige faser er separert av en organisk fase[20]. Ekstraksjonen er avhengig av pH i donorfase og saltkonsentrasjonen i akseptorfase. Aminosyresekvensen til peptidet spiller en stor rolle for ekstraksjonen. Viktige momenter er hydrofile eller hydrofobe aminosyrer og pK_a -verdier til side- og endegrupper på peptidene som påvirkes av pH i fasene.

For å frakte aminosyrer med ladning over en organisk membran brukes det ofte en bærer. Forskjellige typer bærere er prøvd ut; D2EHPA[21-23], flere typer "crown ethers"[24-26], karboksylert polystyren som vil fungere som en kationbytter[27] og sykliske karboksylsyrederivater[28]. Aminosyrer som Trp[22, 25, 28], Ala[26, 29], Asp[22, 26], Phe[21-27, 29], Leu[25, 26] og Glu[22] har blitt undersøkt i membransystemer. Effekten av å variere ulike parametere som pH i prøveløsning[22-24], faseforhold mellom donorfase og akseptorfase[22], ulike bærere[23, 25] og konsentrasjonen av disse har blitt prøvd med de overnevnte aminosyrer som modellsubstanser. Det har i tillegg blitt gjort flere forsøk med selektiv transport av di- og tripeptider over membraner[20, 30, 31]. LPME er et slikt membransystem[2, 32]. Det har også blitt vist at transport av ladede polare legemidler gjennom membranen kan effektiviseres ved tilsetning av et motion til donorfasen[33, 34].

Peptider kan på den samme måten fraktes over membranen. Ved å tilsette en sulfonsyre til donorfase, blir det dannet et hydrofobt kompleks med peptidet som går over i organisk fase og videre til akseptorfase der sulfonsyren blir spaltet av og peptidet fanget[6].

4.2 VÆSKEFASEMIKROEKSTRAKSJON, LPME

LPME er en forholdsvis ny prøveopparbeidelsesteknikk utviklet til effektiv prøveopprensing og høy oppkonsentrering av legemidler fra biologisk prøver[3, 32, 35]. Legemiddelet i den biologiske prøven ekstraheres gjennom en porøs hulfiber impregnert med et organisk løsningsmiddel og inn i en akseptorfase på innsiden av fiberen. Prinsippet for oppbygging av ekstraksjonsenheten er vist i figur 4-4.



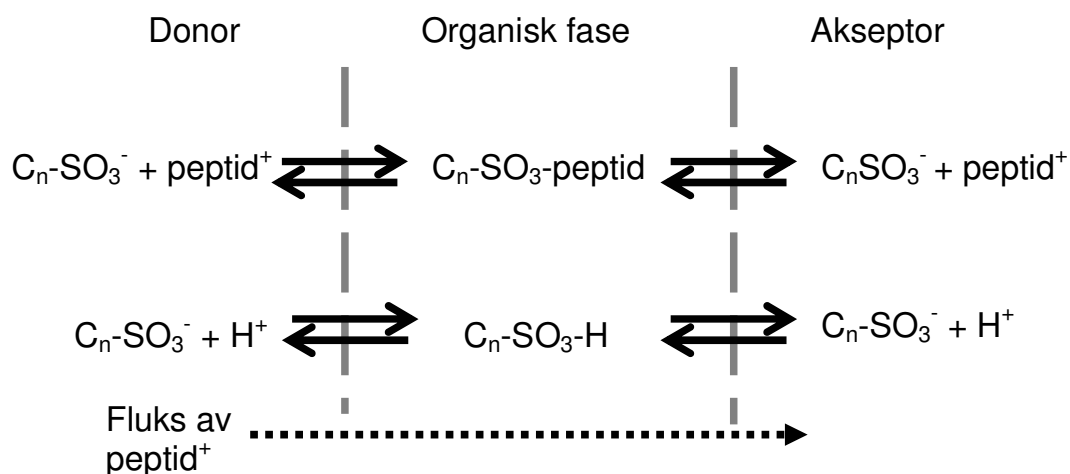
Figur 4-4 Skjematisk oversikt av ekstraksjonsenhet.

Ekstraksjonsenheten er oppbygd rundt en prøveholder med skrukork med silikonseptum. Volum av prøveholder kan varieres, og størrelser mellom 0,2 og 4,0 ml er det mest vanlige. To kanyler er ført gjennom skrukorkens silikonseptum. Den ene anvendes til å introdusere akseptorløsningen i fiberens hulrom før ekstraksjonen, mens den andre brukes til oppsamling

av akseptorløsning etter endt ekstraksjon. De to endene av kanylene er bundet sammen med en porøs hulfiber av polypropylen og danner en loop. Størrelsen på fiberen er typisk 6,5 cm lang, 600 μm indre diameter og med en porestørrelse på 0,2 μm . Ved ekstraksjon overføres prøveløsningen (donorfasen) til prøveholderen. pH i donorfasen justeres slik at analytten har ønsket ladning. Minst mulig løselighet i donorfasen og størst affinitet for organisk fase er ønskelig.

Ved ekstraksjon av peptider er det nødvendig å tilsette en hydrofob ionpardanner til donorfasen på grunn av peptidenes egenskaper som zwitterioner. Ionpardanneren må ha en pK_a -verdi som er mindre enn pH i donorfasen. Karboksylsyrer er tidligere brukt i LPME, men vil foreligge protonert i donorfasen med peptidene og vil derfor ikke danne ionpar. Sulfonsyrer har pK_a på -1,63 (beregnet ved hjelp av programmet ACD/ChemSketch[36]) og vil være uprotonerte i hele pH-området og kan derfor danne et hydrofobt kompleks med peptidet. Et slikt kompleks vil få en tilnærmet nøytral ladning. På denne måten blir positive eller negative ladninger på peptidet maskert, avhengig av de kjemiske egenskapene til peptidet og ionpardanneren. Fiberen impregneres med et organisk løsningsmiddel for å danne en organisk fase i porene på fiberen. For å gi en stabil organisk fase, må løsningsmiddelet ikke være blandbart med vann, være lite flyktig samt ha god evne til å fukte fiberen[35]. Fiberens indre hulrom fylles til slutt med en akseptorløsning. Den impregnerte fiberen med akseptorfase plasseres i donorløsning. Under ekstraksjon plasseres ekstraksjonsenheten på en roterende vibrator. Dette sørger for at donor- og akseptorløsningen i nærheten av fiberen fornyes hele tiden, og effektiviserer dermed ekstraksjonen.

Ved trefase LPME er akseptorfasen en vandig løsning. Donorfasen består av et stort volum vandig løsning (0,2-1,5 ml). Den organiske fasen består av det organiske løsningsmiddelet i fiberporene. Akseptorfasen er et lite volum, 20 μl , vandig fase. En donorfase på 0,2 ml vil gi en maksimal oppkonsentreringsfaktor på 10, mens en donorfase på 1,5 ml vil gi en maksimal oppkonsentreringsfaktor på 75. En mulig modell for ekstraksjonen av peptider i LPME systemet er vist i figur 4-5.



Figur 4-5 Modell for ekstraksjon av peptid i LPME.

Det første steget er ekstraksjon av peptid over i den organiske fasen. Sulfonsyren binder til peptidet, danner et hydrofobt kompleks og fungerer dermed som en bærer. Komplekset vandrer så over i den organiske fasen og gjennom membranen. På den andre siden kommer komplekset i kontakt med akseptorfase. Akseptorfase har overskudd av H^+ -ioner som vil reagere med sulfonsyren og fortrenge peptidet som blir frigitt i akseptorfase. Peptidet blir positivt ladet og løses i akseptorløsningen. Ved siden av høy oppkonsentrering er systemet svært kompatibelt med HPLC, da akseptorfase er vandig og kan dermed injiseres direkte i HPLC. I kombinasjon med MS-deteksjon kan man utvikle følsomme metoder for å analysere peptider i form av legemidler eller endogene biomarkører.

4.3 VÆSKEKROMATOGRAFI, HPLC

Prinsippet bak separasjon i HPLC er fordeling av et stoff mellom en stasjonærfase og en mobilfase. Er den stasjonære fasen hydrofil og den mobile fasen hydrofob kalles dette normal fase kromatografi. Er derimot stasjonærfase hydrofob og mobilfasen hydrofil kalles det omvendt fase kromatografi. Kolonnen er pakket med små porøse partikler der den hydrofobe stasjonære fasen (hydrokarbonkjeder) oftest er kjemisk bundet til bærematerialet. Til lengre hydrokarbonkjeder, til større blir retensjonen. Silika er det mest brukte bærematerialet. Omvendt fase kromatografi er mest utbredt, og vil bli benyttet i denne oppgaven. Som mobilfase benyttes blandinger av vann og en organisk modifikator som er fullstendig blandbar

med vann, for eksempel ACN. Økende innhold av organisk modifikator vil gi mindre retensjon av analytten på kolonnen. Både isokratisk eluering og gradient eluering kan brukes ved omvendt fase kromatografi. Ved isokratisk eluering er mobilfasens sammensetning konstant gjennom hele kjøringen. Når gradienteluering benyttes endrer styrken av mobilfasen seg under selve analysen. Gradienteluering er svært godt egnet ved separering av stoffer med stor forskjell i retensjon. Dette vil forkorte analysetiden. En annen fordel med gradienteluering er smalere topper i kromatogrammet.

For å kunne eluere ioner ved hjelp av omvendt fase kromatografi, kan ionparkromatografi anvendes. Retensjonen av et ion øker hvis mobil fase tilsettes et hydrofobt ion med motsatt ladning. Det vil dermed dannes et hydrofobt ionpar. Retensjonen er avhengig av egenskapene til mobil fase, type ionpardanner og konsentrasjon av denne.

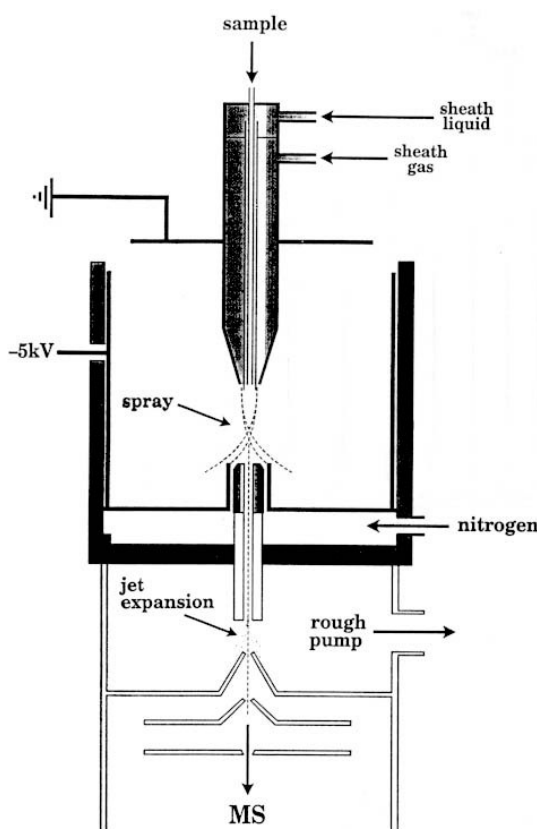
Væskekromatografi kan brukes både til kvalitativ og kvantitativ deteksjon av analytter. I HPLC blir analytten injisert på kolonnen hvor mobilfasen presses med konstant hastighet gjennom. Det stoffet som har minst interaksjon med stasjonærfasen vil elueres først. Retensjonstiden t_R karakteriserer retensjonen. Retensjonstiden for ulike analytter vil variere med hvor mye interaksjon med stasjonærfasen stoffet har. Ved helt like HPLC-betingelser vil retensjonstiden til en bestemt analytt være den samme. Dette kan brukes til å identifisere ukjente stoffer ved å sammenligne med kromatogrammet av et kjent stoff. Man kan også utføre kvantitative analyser på en bestemt analytt. Dette gjøres ved å sammenligne høyden eller arealet til den identifiserte toppen av analytten, og sammenligner med en ekstern eller intern standard. Flere typer detektorer kan brukes til væskekromatografi. Hvilken detektor som velges avhenger av egenskapene og ønsket deteksjonsgrense til stoffet som skal analyseres. I store deler av oppgaven ble UV-detektor med deuteriumlampe benyttet.

4.4 LC-MS

Utviklingen av en LC-MS metode ble ikke vektlagt i dette hovedfaget. Den teoretiske beskrivelsen av LC-MS vil derfor bare inneholde det mest nødvendige.

I et LC-MS apparat er en væskekromatograf koblet til et massespektrometer (MS). For å få mobilfasen og analyttene i gassfasen eksisterer det flere typer grensesnitt mellom LC og MS.

De mest brukte er APCI og ESI. I denne oppgaven ble ESI benyttet. Væsken fra LC blir ført gjennom et kapillær inn i en liten nål. Ved enden på nålen blir væsken brutt opp i små dråper av forstøvergassen og en elektrisk spenning satt på nålen. Positivt eller negativt ladede dråper blir dannet, avhengig av polaritet av spenningen. Dråpene som blir sprayet inn har alle samme polaritet da ioner med motsatt ladning blir avsatt på kapillæret/nålen. I positiv modus blir hovedsakelig $[M+H]^+$ -ioner dannet, mens $[M-H]^-$ -ioner blir dannet i negativ modus. Ionisering skjer i væskefasen og er pH-avhengig. Figur 4-6 viser en skjematisk skisse av ESI. Prøven blir injisert fra LC, gjennom ESI og til MS.



Figur 4-6 Figuren viser en skjematisk skisse av grensesnittet mellom LC og MS, ESI[37].

Før ionene kan analyseres av MS må mobilfasen fjernes. Dette skjer ved hjelp av en tørkegass. Tørkegassen gjør dråpene mindre og ved et punkt blir frastøtningen mellom dråpene sterkere enn overflatespenningen. Dette fører til en Coulombeksplosjon som gir mindre dråper. Denne prosessen gjentar seg til man oppnår emisjon av ioner fra dråpens overflate. På vei til massespektrometeret passerer ionene gjennom et kapillær som er varmet opp, et sett av samlere og linser. Fra inngangen av kapillæret til utgangen av samlerne skjer det en stor trykkreduksjon. Polariteten til spenningen ved inngangen til kapillæret er alltid

motsatt av ionene som skal analyseres. Forskjell i spenning mellom samlerne fører til at ionene blir akselerert mellom disse. Linsene fokuserer ionestrømmen.

Flere typer masseanalysatorer kan brukes, men en kvadrupol ble benyttet i dette systemet. En kvadrupol består av fire parallelle staver. Avhengig av m/z -verdier og spenningen som blir pålagt stavene, starter ionene å bevege seg i feltet. Ionene som oppnår stabil resonans vil passere gjennom kvadrupolen, mens ioner med ustabil resonans vil kollideres med en av stavene. De stabile ionene vil detekteres og intensiteten av m/z -verdier blir målt. Bare et lite utvalg av m/z -verdier vil slippe gjennom kvadrupolen og selektiviteten kan justeres ved å forandre på spenningen over stavene.

5 EKSPERIMENTELT

5.1 KARAKTERISTIKK AV PEPTIDER

Tabell 5-1 Tabellen viser molekylvekt for peptidene.

Peptid	Molekylær vekt (g/mol)
Neurotensin	1672,9
Neurotensin 1-8	1029
Neurotensin 1-6	776,85

Tabell 5-2 Tabellen viser pK_a-verdier for terminale grupper og sidegrupper med basiske eller sure egenskaper hos peptidene[38].

Peptider	R-grupper med pK _a -verdi							
	pK _a α-	pK _a α-	3	4	6	8	9	11
	NH ₂	COOH	TYR	GLU	LYS	ARG	ARG	TYR
NT	-	2,36	10,06	4,25	10,52	12,48	12,48	10,06
NT 1-8	-	2,36	10,06	4,25	10,52	12,48		
NT 1-6	-	2,36	10,06	4,25	10,52			

Tabell 5-3 Tabellen viser Log P-verdier til aminosyrene[39].

Ikke polar sidekjede		Polar uladet sidekjede		Ladet polar sidekjede	
Aminosyre	Log P	Aminosyre	Log P	Aminosyre	Log P
LEU	-1,61	ASN	-3,41	GLU	-3,69
PRO	-2,50	TYR	-2,26	LYS	-3,05
ILE	-1,72	pGLU	-	ARG	-4,20

5.2 PEPTIDER, KJEMIKALIER OG UTSTYR

Tabell 5-4 og 5-5 viser peptider og kjemikalier brukt under eksperimentene. Tabell 5-6 viser utstyr som ble brukt.

Tabell 5-4 Peptider.

Peptid	Leverandør
Neurotensin	Sigma, St.Louis, MO, USA
Neurotensin 1-6	Bachem, Bubendorf, Sveits
Neurotensin 1-8	Bachem, Bubendorf, Sveits

Tabell 5-5 Kjemikalier (fortsetter på neste side).

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniakk-løsning 25 %	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
n-decyl alkohol		Sigma, St.Louis, MO, USA
di-Natriumhydrogenfosfat-2-hydrat	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
2,4-dinitrobenzensulfonsyre natriumsalt	Analysekvalitet	Fluka, Buchs, Sveits
Dodecyldimetyletylammoniumbromid		Fluka, Buchs, Sveits
Dodecyltrimetylammoniumbromid		Sigma, St.Louis, MO, USA
Eddiksyre	Analysekvalitet	Prolabo, Manchester, England
1-heksanol		Fluka, Buchs, Sveits
1-heptanol		Sigma, St.Louis, MO, USA
1-heptansulfonsyre natriumsalt		Sigma, St.Louis, MO, USA
6-hydroksey-2-naftalensulfonsyre natriumsalt		Aldrich, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Kalsiumklorid-2-hydrat	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Litiumsulfat	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Maursyre 98-100 %	Analysekvalitet	Riedel de Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Tyskland
Metanol	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland

Natrium 1-heksansulfonat monohydrat	Analysekvalitet	Fluka, Buchs, Sveits
Natriumacetat vannfri	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat-1-hydrat	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid perler	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
1-nonanol		Sigma, St.Louis, MO, USA
1-nonansulfonsyre natriumsalt		Fluka, Buchs, Sveits
1-oktanol	99 %	Aldrich, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
1-oktansulfonsyre natriumsalt		Sigma, St.Louis, MO, USA
Saltsyre 37 %	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tetraetylammoniumbromid		Sigma, St.Louis, MO, USA
Tetrapropylammoniumklorid		Sigma, St.Louis, MO, USA
tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Analysekvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Vann	Renset med EASYpure™	

Tabell 5-6 Utstyr (fortsetter på neste side).

Utstyr	Typebetegnelse	Produsent
HPLC		
Pumpe	LC-9A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Blandekammer	FCV-10AL <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Autoinjektor	231-401	Gilson, Middletown, WI, USA
UV-detektor	SPD-6AV	Shimadzu, Kyoto, Japan
Programvare	Class- <i>vp</i> 4.3	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kolonne	ChromSep HPLC 50×2 mm Inertsil® ODS-3	Varian, Middelburg, Nederland
Forkolonne	Javelin Guards and Filters BDS C8 10×2 mm	Thermo Electron Corporation
LC-MS		
Pumper	LC-10AD <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan

MS	LCMS-2010A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
System controller	SCL-10A <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Auto injektor	SIL-10AD <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kolonne	ChromSep HPLC 50×2 mm Inertsil® ODS-3	Varian, Middelburg, Nederland
Programvare	LCMSsolution 2.04-H3	Shimadzu, Kyoto, Japan
Øvrig		
Kanyler	0,8 × 40 mm og 0,8 × 50 mm	Terumo, Leuven, Belgia
Prøveholdere	2 ml	Chromacol, Trumbull, CT, USA
	0,1 ml	VWR International, Leuven, Belgia
Sprøyter	2 ml	Terumo, Leuven, Belgia
Ekstraksjonsfiber	Accurel® PP Q3/2 polypropylen hulfiber (indre diameter 600 µm, veggtykkelse 200 µm, porestørrelse 0,2 µm)	Membrana, Wuppertal, Tyskland
Injiseringssprøyte	Microliter #805	Hamilton, Bonaduz, Sveits
Ultralydbad	Branson 2200	Branson, Connecticut, USA
Vibrator	Vibramax 100	Heidolph, Kelheim, Tyskland
Vekt	AE 200	Mettler, Sveits
pH-meter	E 632 Digital pH-meter	Metrohm Ltd., Sveits
Automatpipetter	Finnpipette	Thermo Labsystems, Helsinki, Finland
Pipettespisser	Finntip®	Thermo Labsystems, Helsinki, Finland
Vannrenseanlegg	EASYpure UV D7402	Barnstead, Dubuque, IA, USA
Vortex-mikser	Vibrofix VF1	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland

5.3 TILLAGING AV LØSNINGER OG BUFFERE

5.3.1 Peptider

1,0 mg av hvert peptid blei veid inn og deretter løst i 10 ml destillert vann. Ved hjelp av automatpipette ble løsningen fordelt på 20 enheter på 0,5 ml med konsentrasjon på 100 µg/ml. Enhetene ble frosset ned og lagret ved -32 °C. Før prøveopparbeidelse ble de 3 peptidene blandet sammen. Dette ble gjort ved å blande 0,5 ml av hver enkelt peptidløsning med 1,0 ml destillert vann til totalt 2,5 ml. Konsentrasjonen av peptidblandingen ble da 20 µg/ml.

5.3.2 LPME

5.3.2.1 Variasjoner i donorfase

Donorfaser ferdig til ekstraksjon ble laget ved å tilsette 250 µl peptidblanding (20µg/ml) til 750 µl av en donorløsning og ble blandet godt. Donorløsningens sammensetning varierte i de ulike eksperimentene.

pH

For å oppnå ulik surhetsgrad i donorfasen ble fosfatbuffer, acetatbuffer, citratbuffer og HCl benyttet til å justere pH på løsningen. Det ble laget hjelperløsninger av HCl på 0,2 M og 0,01 M fra konsentrert HCl for å gjøre tillaging av de enkelte løsningene enklere. Glasspipette ble benyttet for å måle ut konsentrert HCl.

25 mM acetatbuffer pH 4,0 og 5,0:

25 mM løsning av CH₃COOH (71 µl konsentrert eddiksyre fortynnet til 50 ml med vann) ble titrert med 25 mM løsning av CH₃COONa (0,103 g i 50 ml vann) til pH 4,0 og 5,0.

25 mM fosfatbuffer pH 6,0, 7,0 og 8,0:

25 mM løsning av NaH₂PO₄ (0,173 g i 50 ml vann) ble titrert med 25 mM løsning av Na₂HPO₄ (0,223 g i 50 ml vann) til pH 6,0, 7,0 og 8,0.

6,25 mM citratbuffer pH 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 og 5,0:

12,5 mM løsning av tri-Natriumcitrat-2-hydrat (0,368 g i 100 ml vann) ble fortynnet med vann til ~85 ml. Løsningene ble titrert med 0,2 M HCl til ønsket pH (2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 og 5,0) og fylt opp med vann til 100 ml.

0,01 M HCl:

830 µl konsentrert HCl fortynnet med destillert vann til 1000 ml.

0,2 M HCl

16,56 ml konsentrert HCl fortynnet med destillert vann til 1000 ml.

For å lage ferdig donorfase ble stamløsningene av HCl fortynnet med destillert vann og en hjelpeløsning på 100 mM 1-heptansulfonsyre. For alle ferdige donorløsninger var konsentrasjon av ionpardanner 50 mM. Automatpipetter ble brukt til å måle opp løsninger for å lage den ferdige donorfasen.

100 mM 1-heptansulfonsyreløsning (C₇-SO₃):

1,011 g 1-heptansulfonsyre natriumsalt ble løst i destillert vann og fortynnet til 50 ml.

Tabell 5-7 og 5-8 viser tilberedning av donorløsninger med ulike pH-verdier som blandet med peptidblanding utgjorde donorfasen i ekstraksjonen. Som organisk fase ble 1-oktanol brukt og 0,01 M HCl (se tabell 5-13) som akseptorfase.

Tabell 5-7 Tilberedning av donorløsninger med ulike konsentrasjoner av HCl (fortsetter på neste side).

Konsentrasjon	pH	Tilberedning
HCl		
0,1 M	1,2	2,5 ml 0,2 M HCl ble fortynnet med 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
0,03 M	1,5	0,75 ml 0,2 M HCl ble fortynnet med 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃ og 1,75 ml destillert vann
0,01 M	2,0	0,25 ml 0,2 M HCl ble fortynnet med 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃ og 2,25 ml destillert vann
0,003 M	2,6	1,5 ml 0,01 M HCl ble fortynnet med 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃ og 1,0 ml destillert vann
0,001 M	3,0	0,5 ml 0,01 M HCl ble fortynnet med 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃ og 2,0 ml destillert vann

0,3 mM	3,7	300 µl 0,01 M HCl ble fortynnet med 4,7 ml destillert vann og 5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
0,1 mM	4,3	100 µl 0,01 M HCl ble fortynnet med 4,9 ml destillert vann og 5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃

De ferdige donorfasene med forskjellige buffere ble laget ved å fortynne hjelperøsningene med buffer med 100 mM 1-heptansulfonsyreløsning (C₇-SO₃).

Tabell 5-8 Tilberedning av donorløsninger med acetat-, fosfat-, og citratbuffer.

Buffer	pH	Tilberedning
Acetatbuffer	4,0	2,5 ml 25 mM acetatbuffer pH 4,0 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Acetatbuffer	4,9	2,5 ml 25 mM acetatbuffer pH 5,0 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Fosfatbuffer	5,8	2,5 ml 25 mM fosfatbuffer pH 6,0 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Fosfatbuffer	6,8	2,5 ml 25 mM fosfatbuffer pH 7,0 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Fosfatbuffer	7,8	2,5 ml 25 mM fosfatbuffer pH 8,0 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Citratbuffer	2,8	2,5 ml 12,5 mM citratbuffer pH 2,5 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Citratbuffer	3,2	2,5 ml 12,5 mM citratbuffer pH 3,0 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Citratbuffer	3,8	2,5 ml 12,5 mM citratbuffer pH 3,5 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Citratbuffer	4,1	2,5 ml 12,5 mM citratbuffer pH 4,0 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Citratbuffer	4,6	2,5 ml 12,5 mM citratbuffer pH 4,5 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃
Citratbuffer	5,0	2,5 ml 12,5 mM citratbuffer pH 5,0 ble tilsatt 2,5 ml 100 mM C ₇ -SO ₃

1-heptansulfonsyre konsentrasjon

Ulike konsentrasjoner av ionpardanneren 1-heptansulfonsyre i donorfase ble prøvd for å se peptidenes utbytte/oppkonsentrering i LPME-systemet. Det ble valgt å gjøre forsøkene ved konstant HCl-konsentrasjon. Tabell 5-9 viser ulike blandingsforhold av en 0,6 M 1-heptansulfonsyreløsning og en 0,001 M HCl-løsning. Peptider ble tilsatt som beskrevet i starten av kapittel 5.3.2.1. 1-oktanol ble brukt som organisk fase og akseptorfasen bestod av 0,01 M HCl (tabell 5-13).

0,6 M 1-heptansulfonsyreløsning, 0,001 M HCl:

1,213 g 1-heptansulfonsyre natriumsalt ble løst i 1 ml 0,01 M HCl og fortynnet med destillert vann til 10 ml.

0,001 M HCl

10 ml 0,01 M HCl ble fortynnet til 100 ml med destillert vann.

Tabell 5-9 Tilberedning av donorfaser med ulike konsentrasjoner av 1-heptansulfonsyre. Konsentrasjonen av HCl var 0,001 M i alle donorfaseene.

Konsentrasjon	pH	Fremgangsmåte
0 mM	2,8	5 ml 0,001 M HCl
50 mM	3,0	417 µl 0,6 M C ₇ -SO ₃ ble fortynnet med 4,583 ml 0,001 M HCl
75 mM	3,0	625 µl 0,6 M C ₇ -SO ₃ ble fortynnet med 4,375 ml 0,001 M HCl
150 mM	3,1	1,25 ml 0,6 M C ₇ -SO ₃ ble fortynnet med 3,75 ml 0,001 M HCl
300 mM	3,2	2,5 ml 0,6 M C ₇ -SO ₃ ble fortynnet med 2,5 ml 0,001 M HCl

Donorfasevolum

En ferdig løsning av 50 mM 1-heptansulfonsyre i 0,001 M HCl ble sammen med peptidblandingen på 20 µg/ml brukt til å lage donorfaser med ulikt volum. Tabell 5-10 viser sammensetningen av donorfaseene. 0,01 M HCl (tabell 5-13) ble brukt som akseptorfase og som organisk fase ble 1-oktanol benyttet.

Tabell 5-10 Tilberedning av donorfaser med ulike volumer (fortsetter på neste side).

Volum	Fremgangsmåte
0,2 ml	50 µl peptidblanding ble blandet med 150 µl 50 mM C ₇ -SO ₃ , 0,001 M HCl
0,6 ml	150 µl peptidblanding ble blandet med 450 µl 50 mM C ₇ -SO ₃ , 0,001 M HCl

1,0 ml	250 µl peptidblanding ble blandet med 750 µl 50 mM C ₇ -SO ₃ , 0,001 M HCl
1,5 ml	375 µl peptidblanding ble blandet med 1125 µl 50 mM C ₇ -SO ₃ , 0,001 M HCl

Ulike ionpardannere

Ionpardannere med ulike egenskaper ble prøvd ut for å optimalisere utbyttet ved prøveopparbeidelse. Alle ionpardannere var sulfonsyrer med ulike sidekjeder. Sulfonsyrene ble løst i 0,01 M HCl og fortynnet med vann (se tabell 5-11). Konsentrasjon av HCl ble da 0,001 M HCl som tilsvarer pH 3. Konsentrasjonen av sulfonsyreløsningene var 0,05 M for alle sulfonsyrene. Da det ble observert såpedannelse ved tillaging av 6-hydroksy-2-naftalensulfonsyre løsningen, ble det i tillegg laget en løsning på 0,01 M av denne ionpardanneren. Peptidblanding ble tilsatt som beskrevet først i kapitlet. 1-oktanol ble brukt som organisk fase og 0,01 M HCl (se tabell 5-13) ble brukt som akseptorfase.

Tabell 5-11 Tilberedning av donorfaser med forskjellige ionpardannere. 0,01 M HCl i alle løsningene.

Konsentrasjon	Ionpardanner	Tilberedning
0,05 M	Natrium 1-heksansulfonat monohydrat	0,0516 g ble løst i 0,5 ml 0,01 M HCl og fortynnet til 5 ml med vann
0,05 M	1-heptansulfonsyre natriumsalt	0,0506 g ble løst i 0,5 ml 0,01 M HCl og fortynnet til 5 ml med vann
0,05 M	1-oktansulfonsyre natriumsalt	0,0541 g ble løst i 0,5 ml 0,01 M HCl og fortynnet til 5 ml med vann
0,05 M	1-nonansulfonsyre natriumsalt	0,0576 g ble løst i 0,5 ml 0,01 M HCl og fortynnet til 5 ml med vann
0,05 M	2,4-dinitrobenzensulfonsyre natriumsalt	0,0675 g ble løst i 0,5 ml 0,01 M HCl og fortynnet til 5 ml med vann
0,05 M	6-hydroksy-2-naftalensulfonsyre natriumsalt	0,0616 g ble løst i 0,5 ml 0,01 M HCl og fortynnet til 5 ml med vann
0,01 M	6-hydroksy-2-naftalensulfonsyre natriumsalt	0,0123 g ble løst i 0,5 ml 0,01 M HCl og fortynnet til 5 ml med vann

Ulike ionpardannere i basisk miljø

Kvartære ammoniumsalter med ulike kjedelengder ble brukt som ionpardannere i donorfasen i basisk miljø i LPME-systemet. Ammoniumsaltene ble løst i 0,1 M NaOH.

0,1 M NaOH:

0,40 g NaOH perler ble løst i vann og fortynnet til 100 ml.

Konsentrasjonen for ionpardannerene løst i NaOH var 50 mM. Akseptorfase som ble brukt var 0,01 M HCl (tabell 5-13) og organisk fase var 1-oktanol. Tabell 5-12 viser tilberedning av donorløsninger som ble blandet med peptidblanding som beskrevet tidligere i kapitlet.

Tabell 5-12 Tilberedning av donorfaser med forskjellige ionpardannere i basisk miljø.

Ionpardanner	pH	Tilberedning
Dodecyltrimetylammoniumbromid	12,7	0,0771 g ble løst i 5,0 ml 0,1 M NaOH
Tetrapropylammoniumklorid	12,8	0,0555 g ble løst i 5,0 ml 0,1 M NaOH
Dodecyldimetyletylammoniumbromid	12,8	0,0806 g ble løst i 5,0 ml 0,1 M NaOH
Tetraetylammmoniumbromid	12,8	0,0526 g ble løst i 5,0 ml 0,1 M NaOH

Bruk av negativ og positiv ionpardanner samtidig

Løsning med 50 mM 1-heptansulfonsyre, 0,01 M HCl som beskrevet over ble brukt som donorfase. Etter tilsetning av peptid og risting på roterende vibrator i 25 minutter, ble 0,5 ml positiv ionpardanner tilsatt donorfasen. Løsningen ble så ristet i 20 minutter til. Løsninger av ammoniumklorid og tetraetylammmoniumbromid på 0,2 M i 0,01 M HCl ble brukt som positive ionpardannere.

0,2 M NH₄Cl:

0,107 g ble løst i 10 ml 0,01 M HCl.

0,2 M C₈H₂₀NBr:

0,4204 g ble løst i 10 ml 0,01 M HCl.

Andre donorfaser

I tillegg ble en løsning med 50 mM 1-oktansulfonsyre i 0,01 M HCl anvendt under variasjon av akseptorfaser:

50mM 1-oktansulfonsyre 0,01 M HCl:

0,1082 g 1-oktansulfonsyre ble løst i 10 ml 0,01 M HCl.

5.3.2.2 Organisk fase

Rene løsninger ble brukt av;

1-heksanol, 1-heptanol, 1-oktanol, 1-nonanol og 1-decyl alkohol (1-decanol) til å mette porene i fiberen.

5.3.2.3 Variasjoner i akseptorfase

pH

Akseptorfaser med ulike pH-verdier ble laget ved hjelp av HCl-løsninger og buffere (se tabell 5-13).

Tabell 5-13 Tilberedning av akseptorfaser med ulike pH-verdier ved hjelp av HCl og ammoniumformiatbuffer.

Akseptor	pH	Tilberedning
1,0 M HCl	0	8,28 ml 37 % HCl ble fortynnet til 100 ml med destillert vann
0,2 M HCl	0,77	16,56 ml 37 % HCl ble fortynnet til 1 liter med destillert vann
0,1 M HCl	1,06	5 ml 0,2 M HCl ble fortynnet til 10 ml med destillert vann
0,01 M HCl	1,88	830 µl 37 % HCl ble fortynnet til 1 liter med destillert vann
0,001 M HCl	2,88	1 ml 0,01 M HCl ble fortynnet til 10 ml med destillert vann
10 mM ammoniumformat- buffer	4,06	10 mM løsning av HCOOH (18,9 µl fortynnet til 50 ml med destillert vann) ble titrert med fortynnet 25 % ammoniakkløsning til pH 4,06

Tilsetning av positive ioner til akseptorfase

Akseptorfaser ble laget ved å løse Li^+ , Ca^{2+} og NH_4^+ -salter i 0,01 M HCl (se tabell 5-14). Konsentrasjonen ble variert slik at antall positive ladninger var den samme i alle akseptorfasene.

Tabell 5-14 Tilberedning av akseptorfaser med tilsetning av ulike positive ioner. 0,01 M HCl.

Salt	Konsentrasjon (M)	Tilberedning
Li ₂ SO ₄	0,1	0,128 g ble løst i 10 ml 0,01 M HCl
CaCl ₂	0,1	0,147 g ble løst i 10 ml 0,01 M HCl
NH ₄ Cl	0,2	0,107 g ble løst i 10 ml 0,01 M HCl

5.3.3 Prøveopparbeidelse i urin

For å oppnå en lik konsentrasjon av ionpardanner (37,5 mM) i den endelige donorfase (tilsatt peptid) med urin som i vann, ble det laget en ny løsning av 1-oktansulfonsyre.

65 mM 1-oktansulfonsyreløsning:

0,141 g 1-oktansulfonsyre ble løst i 10 ml 0,01 M HCl

Urin ble tilsatt peptid i ulike konsentrasjoner:

10 µg/ml: 250 µl urin ble tilsatt 250 µl peptidblanding (20 µg/ml).

5 µg/ml: 300 µl urin ble tilsatt 100 µl peptidblanding (20 µg/ml).

2,5 µg/ml: 350 µl urin ble tilsatt 50 µl peptidblanding (20 µg/ml).

For å lage den ferdige donorfasen, ble urin fortynnet med donorfase og pH justert til 2 med 0,2 M HCl.

Tabell 5-15 Tilberedning av donorfaser av urin med ulike konsentrasjoner peptid.

Urin	Tilberedning
10 µg/ml	Løsningen ble fortynnet med 750 µl 1-oktansulfonsyreløsning og tilsatt 70 µl 0,2 M HCl
5 µg/ml	Løsningen ble fortynnet med 750 µl 1-oktansulfonsyreløsning og tilsatt 90 µl 0,2 M HCl
2,5 µg/ml	Løsningen ble fortynnet med 750 µl 1-oktansulfonsyreløsning og tilsatt 90 µl 0,2 M HCl

5.3.4 Prøveopparbeidelse før LC-MS

En stamløsning av neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8 på 500 ng/ml ble brukt til å lage donorfase i vann og urin. Denne ble laget ved å fortynne 30 µl peptidblanding på 25 µg/ml (0,5 ml av henholdsvis neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8 fortynnet med 0,5 ml vann) med 1470 µl vann.

Vann

Donorfase med 125 ng/ml neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8:

250 µl peptidblanding ble tilsatt 750 µl 50 mM 1-oktansulfonsyre, 0,01 M HCl.

Urin

Urin ble tilsatt peptid:

167 ng/ml: 300 µl urin ble tilsatt 100 µl peptidblanding (500 ng/ml).

Løsningen ble fortynnet med 750 µl 65 mM 1-oktansulfonsyre, 0,01 M HCl og 90 µl 0,2 M HCl.

5.3.5 Mobilfaser til kromatografi

Alle utmålinger ble gjort med målesylinder, med unntak av maursyre som ble målt opp med automatpipette og 1-heptansulfonsyre som ble veid inn på analysevekt. Væskene ble blandet i glassflasker og rystet godt. For å fjerne luftbobler, ble mobilfasene behandlet i ultralydbad før de ble tatt i bruk. Mobilfasene til LC-MS ble ikke behandlet i ultralydbad, da bruk av degasser fjerner luftbobler.

HPLC

Det ble først laget en løsning av 0,01 M maursyre og 0,005 M 1-heptansulfonsyre i vann.

0,005 M 1-heptansulfonsyre, 0,01 M HCOOH:

2,023 g 1-heptansulfonsyre ble løst i destillert vann, tilsatt 755 µl HCOOH og fortynnet med destillert vann til 2 l.

Med utgangspunkt i denne løsningen ble mobilfaser laget ved å tilsette ønsket mengde ACN.

Mobilfase A:

ACN : 0,01 M maursyre, 0,005 M 1-heptansulfonsyre (5 : 95 v/v)

Mobilfase B:

ACN : 0,01 M maursyre, 0,005 M 1-heptansulfonsyre (95 : 5 v/v)

LC-MSMobilfase A:

HCOOH : Ionebyttet vann (0,1 : 99,9 v/v)

Mobilfase B:

100 % ACN

5.4 METODER OG PROSEDYRER**5.4.1 Prøveopparbeidelse (LPME)**

Alle prøvene ble opparbeidet ved trefase LPME. To kanyler med ytre diameter 0,8 mm ble ført gjennom silikonseptumet i ekstraksjonsenhets skrukork. En hul porøs fiber av polypropylen på 6,5 cm ble plassert mellom de to kanylene. Den indre diameteren på fiberen var 600 µm og porestørrelsen 0,2 µm.

Fiberen ble dyppet i 1-oktanol i 5 sekunder for å mette fiberens porer med et organisk løsningsmiddel. 1-oktanol ble for det meste brukt, da denne har vist seg å fungere bra ved ionparmediert ekstraksjon i LPME-systemet[34]. Andre organiske løsemidler ble også utprøvd med samme prosedyre. Etter metting av fiberen med det organiske løsningsmiddelet, ble fiberen behandlet med ultralyd i vann i 20 sekunder. Dette ble gjort for å fjerne overskudd av 1-oktanol. Hulfiberen ble så tørket forsiktig med et papirtørkle for å fjerne væske som var igjen på fiberen. Akseptorfasen på 20 µl ble injisert inn i fiberens hulrom ved hjelp av en mikrolitersprøyte via den ene kanylen. Den impregnerte fiberen fylt med akseptorfase ble plassert i prøveholderen med donorløsningen. Den ferdig monterte ekstraksjonsenheten (som vist i figur 4-1) ble plassert på en roterende vibrator med hastighet 1000 rpm i 45 minutter.

Etter endt ekstraksjon ble akseptorløsningen (20 µl) fortynnet med 5 mM 1-heptansulfonsyre og 10 mM maursyre i destillert vann. 50 µl av denne løsningen ble injisert ved hjelp av en mikrolitersprøyte gjennom fiberen via kanylen brukt til introduksjon av akseptorfasen. Den andre kanylen ble brukt som utførselsgang for akseptorløsningen som ble overført til en ny prøveholder. Resten av akseptorfasen ble fjernet fra fiberen ved å legge lufttrykk på kanylen

brukt til introduksjon av akseptorløsningen. Den totale væskemengden i prøveholderen var da 70 µl. Ved bruk av akseptorfaser på 0,1 og 0,2 M HCl ble det i tillegg tilsatt henholdsvis 20 og 40 µl 0,1 M NaOH til akseptorfasene etter ekstraksjonen for å få høy nok pH til å kunne injisere på en silikakolonne. Denne blandingen ble godt blandet før 50 µl ble injisert i HPLC, dette ved å overfylle injeksjonsloopen. Hver ekstraksjonsenhet ble brukt for kun en ekstraksjon. Ved analyse på LC-MS, ble akseptorfasene fortynnet med 50 µl 5 mM 1-heptansulfonsyre og 10 mM maursyre i tillegg til 430 µl 10 mM ammoniumformiatbuffer pH 2,75 (10 mM ammoniakkløsning justert til pH 2,75 med konsentrert HCOOH).

5.4.2 HPLC-metode

Ekstraktene fra prøveopparbeidelsen ble analysert med HPLC.

Betingelsene var som følgende:

Injeksjonsmengde	: 60 µl
Autoinjektor	: 231-401 Gilson
Mobilfase	: A: ACN : 10 mM maursyre, 5 mM 1-heptansulfonsyre (5 : 95 v/v) B: ACN : 10 mM maursyre, 5 mM 1-heptansulfonsyre (95 : 5 v/v)
Loop	: 50 µl
Flow	: 0,5 ml/min
Kolonne	: ChromSep HPLC 50×2 mm Inertsil® ODS-3
Forkolonne	: Javelin Guards and Filters BDS C8 10×2 mm
Deteksjon	: UV, 214 nm
Temperatur	: Romtemperatur
Programvare	: Class- <i>vp</i> 4.3

Tabell 5-16 Tabellen viser mobilfasegradienten til HPLC-metoden.

Tid (min)	Mobilfase A	Mobilfase B
0	91,5 %	8,5 %
20,75	66,6 %	33,4 %
22,75	66,6 %	33,4 %
23,75	91,5 %	8,5 %
51	91,5 %	8,5 %

Kolonnen som ble brukt var en ChromSep HPLC 50×2 mm Inertsil[®] ODS kolonne. Denne kolonnen har tidligere vist å gi god separasjon av mindre modellpeptider[6]. Dette er en C18 kolonne med hydrofobe egenskaper og har maskerte rest-silanol grupper. Før kolonnen ble tatt i bruk ble kolonnen kondisjonert med mobilfase A i 24 timer. Dette fører til at stasjonærfasen blir fuktet, samt at 1-heptansulfonsyre metter kolonnen. Kolonnen vil med dette få bedre og jevnere retarderende egenskaper. For å hindre at uønskede forurensinger skulle sette seg på kolonnen og tette denne, ble det montert en forkolonne med C8 kjeder og dimensjonene 10×2 mm.

Det ble kjørt omvendt fase kromatografi og gradienteluering ble brukt for å separere peptidene. Mobilfasen var tilsatt 0,005 M 1-heptansulfonsyre som danner ionpar med de positive ladningene på peptidene, dette gir økt retensjon av peptidene på kolonnen. Det ble injisert 60 µl fra autoinjektor gjennom en loop på 50 µl. Ved hver serie med kjøring, var den første prøven som ble analysert blank. Dette var for å kontrollere at grunnlinjen i kromatogrammet var riktig. I tillegg ble det for hver 10. prøve, analysert en blank prøve for å kontrollere at grunnlinjen fortsatt hadde ønsket fasong, samt kontrollere om det var carry-over fra foregående analyser. Analysetid for hver enkelt prøve var 51 minutter. Dette inkluderer reekvibrering av kolonnen (5 kolonnevolum). Alle peptidene ble eluert i analysevinduet fra 0 – 20,75 minutter. Kolonnen ble regelmessig vasket med en høyere konsentrasjon av ACN. For å hindre at forurensinger som forkolonnen hadde fanget opp skulle sette seg på analysekolonnen, ble kolonnene snudd før vasking.

5.4.3 Partiell validering

Validering av metoden ble ikke vektlagt, da dette ikke er en bruksferdig metode til analyse av peptidene. Derfor ble bare noen viktige parametere vurdert for å kontrollere metodens respons og om den kunne brukes til å analysere de aktuelle peptidene.

Linearitet

Linearitet beskriver metodens evne til å gi en lineær respons som en funksjon av konsentrasjonen innenfor et gitt område. Lineariteten blir beskrevet ved hjelp av en regresjonslinje og en regresjonskoeffisient (r). Metodens linearitet ble testet i området 0,5 – 75 $\mu\text{g/ml}$. Dette tilsvarer ekstraksjonsutbytter mellom 0,7 % og 105 % (med en maksimal oppkonsentreringsfaktor på 50) i LPME-systemet som dekker både maksimalt utbytte samt lave utbytter. Konsentrasjonene av peptidene neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8 som ble brukt var: 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,0 $\mu\text{g/ml}$, 5,0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ og 75 $\mu\text{g/ml}$. Løsningene ble analysert på HPLC under samme betingelser som ble brukt under analyse av ekstraktene fra LPME.

Presisjon av retensjonstid

For å bestemme presisjonen til retensjonen av peptidene i gradienten, ble 3 referanser analysert hver dag på 4 ulike dager, til sammen 12 analyser. Av dette ble intra-dag RSD og inter-dag RSD beregnet.

Presisjon av topphøyder

Presisjonen av intensiteten til signalet fra de tre peptidene ble beregnet ved å måle høydene på de enkelte toppene. 3 referanser ble analysert hver dag på 4 ulike dager, til sammen 12 analyser. Intra-dag RSD og inter-dag RSD ble beregnet på grunnlag av tallmaterialet.

Stabilitet

For å være sikker på at peptidene var stabile under ekstraksjon og analyse ble peptidene løst i 0,2 M HCl (pH 0,77) og plassert på benken utsatt for lys og romtemperatur over natten, 18 timer. Peptidene ble analysert etter 0 og 18 timer ved at 100 μl av løsningen ble pipettert ut. For å stoppe en eventuell nedbrytningsreaksjon ble det tilsatt 100 μl 1 M NaH_2PO_4 (6,92 g i 50 ml vann) og fortynnet til 1 ml med vann.

5.4.4 LC-MS

Metoden ble utviklet med utgangspunkt i en allerede eksisterende metode for analyse av peptider[40].

LC-betingelser

Injeksjonsmengde	: 40 µl
Mobilfaser	: A: 0,1 % maursyre i ionebyttet vann (v/v) B: 100 % ACN
Kolonne	: ChromSep HPLC 50×2 mm Inertsil® ODS-3
Programvare	: LCMSsolution 2.04-H3
Flow	: 0,2 ml/min

Tabell 5-17 Tabellen viser mobilfasegradienten til LC-MS-metoden.

Tid (min)	Mobilfase A	Mobilfase B
0	95 %	5 %
6	70 %	30 %
7	70 %	30 %
7,5	95 %	5 %
10	95 %	5 %

Tabell 5-18 Tabellen viser betingelsene for MS.

ESI-mode	Positiv
Tørkegass	N ₂
Hastighet tørkegass	20 l/min
Forstøvergass	N ₂
Hastighet forstøvergass	1,5 l/min
Spenning probe	4,5 kV
Kapillærtemperatur	200 °C

5.4.5 Beregning av utbytte og oppkonsentreringsfaktor

Oppkonsentreringsfaktoren (OF) kan defineres som forholdet mellom endelig konsentrasjon av peptid i akseptorfasen, $C_{a, \text{endelig}}$, og initiell konsentrasjon av peptid i donorfase, $C_{d, \text{inituell}}$:

$$OF = C_{a, \text{endelig}} / C_{d, \text{inituell}}$$

Utbyttet er andelen i prosent av donorfaseens initielle konsentrasjon av peptid som har blitt ekstrahert over til akseptorfasen ved endt ekstraksjon ($n_{a, \text{endelig}}$). Utbyttet beregnes ut i fra topphøyden av peptidene etter endt ekstraksjon og topphøyder av rene peptider.

$$\begin{aligned} \text{Utbytte} &= (n_{a, \text{endelig}} / n_{d, \text{inituell}}) * 100 \% \\ &= (V_a / V_d) * OF * 100 \% \end{aligned}$$

V_a og V_d er volumene av henholdsvis akseptorløsning og donorløsning.

I noen forsøk ble innholdet av peptid i donorfase etter ekstraksjon analysert for å beregne hvor mye peptid som var igjen i donorfase.

Andel peptid fortsatt i donorfase = $(C_{d, \text{endelig}} / C_{d, \text{inituell}}) * 100 \%$,
der $C_{d, \text{endelig}}$ er konsentrasjonen av peptid i donorfase etter endt ekstraksjon.

Rest av peptid i organisk fase:

$$C_{\text{org}} = 100 \% - (C_{d, \text{endelig}} - C_{a, \text{endelig}})$$

C_{org} er den andel (%) peptid som er igjen i den organiske fasen.

6 RESULTATER OG DISKUSJON

6.1 METODE FOR ANALYSE AV PEPTIDER

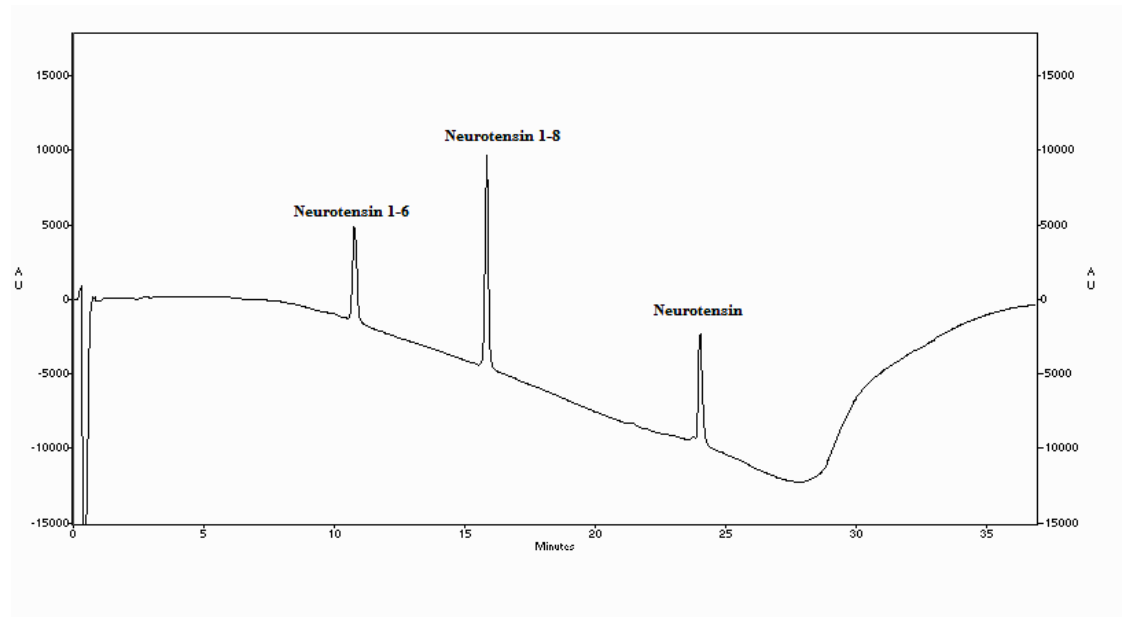
For å utvikle en metode til analyse av peptidene, ble det tatt utgangspunkt i en allerede eksisterende metode for analyse av tripeptider[6]. Til separasjon av peptidene ble det brukt en C18-kolonne med dimensjonene 50×2mm. Denne kolonnen har maskerte restsilanolgrupper. Basiske grupper på peptidene vil derfor ikke binde til rest-silanol gruppene, noe som fører til mindre haledannelse på toppene ved analyse. Mobilfasen som ble benyttet var surgjort med maursyre for å få netto positiv ladning av peptidene. Dermed kunne et negativt ion, 1-heptansulfonsyre, brukes som ionpardanner. Dette var nødvendig for å få tilstrekkelig retensjon av peptidene på kolonnen. Bruk av 1-heptansulfonsyre vil i tillegg gi mindre interaksjon med restsilanolgrupper og dermed mindre haledannelse. Gradienteluering med ACN som organisk modifikator ble benyttet fremfor isokratisk eluering for å gi kortere analysetid. På grunn av den store forskjellen i hydrofobisitet på peptidene ville analysetiden blitt svært lang med isokratisk eluering, og gradienteluering ble derfor foretrukket.

Innledningsvis ble det gjort forsøk med en forholdsvis bratt gradient som dekket et stort område for å være sikre på at peptidene ble eluert, samt kartlegge hvor på gradienten de ulike peptidene ble eluert. Utgangspunktet var en gradient som startet med 100 % mobilfase A og gikk helt til 100 % B. Gradienten ble deretter justert til betingelser som nevnt under avsnittet eksperimentelt. Det ble lagt vekk på at alle peptidene skulle elueres i gradientområdet og ikke i det isokratiske området og gradienten ble tilpasset deretter. Etter hvert ble det klart at det ble sittende en del forurensinger på kolonnen som førte til økt mottrykk i systemet. En C8 forkolonne ble derfor montert for å fange opp forurensingene.

Tabell 6-1 Tabellen viser gjennomsnittlig retensjonstid (t_R) for peptidene.

Peptid	Retensjonstid (t_R) i minutter
Neurotensin 1-6	10,43
Neurotensin 1-8	15,58
Neurotensin	23,70

Tabell 6-1 viser at peptidene eluerer i rekkefølge etter økende hydrofobisitet. Neurotensin er det mest hydrofobe peptidet og har derfor størst interaksjon med stasjonærfasen på kolonnen. Av figur 6-1 fremgår det at man har oppnådd fullstendig grunnlinjeseparasjon av analyttene og at de eluerer i smale symmetriske topper.



Figur 6-1 Kromatogrammet viser analyse av neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8 i HPLC med metode beskrevet i kapittel 5.5.

6.1.1 Partiell validering

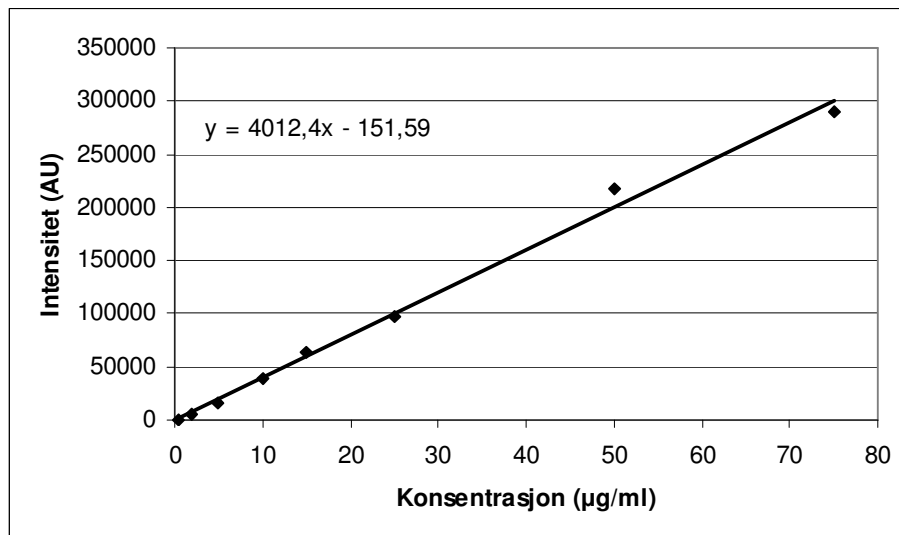
Linearitet

For å kontrollere at responsen til metoden var lineær med konsentrasjonen av peptidene, ble referanseløsninger med ulike konsentrasjoner av analyttene testet i systemet. Konsentrasjoner mellom 0,5 µg/ml og 75 µg/ml ble brukt. Dette vil tilsvare ekstraksjonsutbytter i LPME-systemet på mellom 0,7 % og 105 %, med en maksimal oppkonsentreringsfaktor på 50. Tabell 6-2 viser linearitetskoeffisienten til konsentrasjonskurvene til peptidene.

Tabell 6-2 Tabellen viser r^2 for neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8.

Peptid	r^2
Neurotensin	0,994
Neurotensin 1-6	0,995
Neurotensin 1-8	0,997

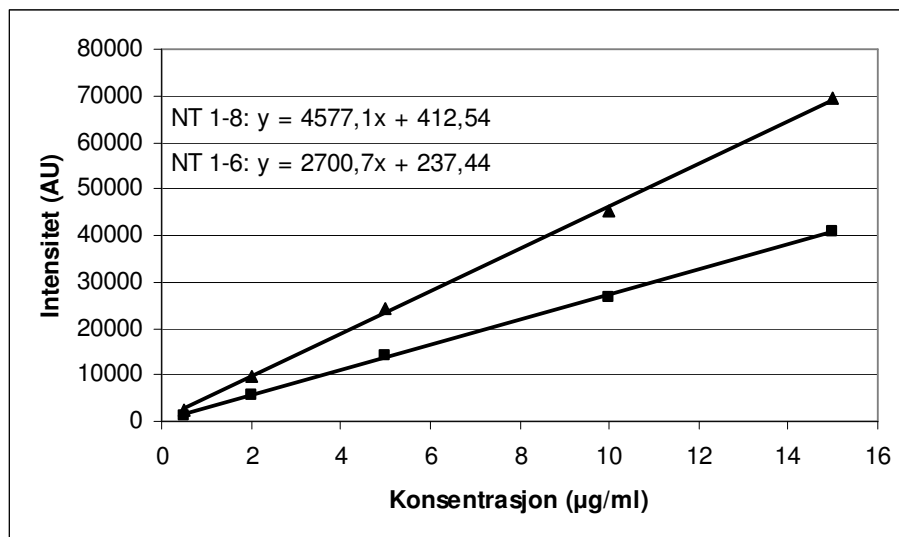
Resultatene viser at responsen øker lineært med konsentrasjonen av peptidene. Neurotensin har vist høye utbytter i LPME-systemet, og en konsentrasjonskurve for store deler av området vil derfor være nødvendig. Kalibreringskurven til neurotensin er vist i figur 6-2.



Figur 6-2 Kalibreringskurve for Neurotensin (♦).

Funksjonen viser at den rette linjen nesten krysser y-aksen i origo. En ideell kurve vil krysse nøyaktig gjennom origo da metoderesponsen til konsentrasjon på 0 µg/ml skal være 0. Verdien av b er bare 0,05 % av verdien til punktet med høyest intensitet i kurven. Dette illustrerer den store skalaen kurven strekker seg over og at kurven i praksis derfor krysser gjennom origo selv om b ikke er 0.

For metabolittene NT 1-6 og 1-8 var ekstraksjonsutbyttene mye lavere og det nedre området på konsentrasjonskurven vil være mer interessant. Figur 6-3 viser kalibreringskurven til NT 1-6 og NT 1-8 i nedre konsentrasjonsområde.



Figur 6-3 Kalibreringskurve for NT 1-6 (▲) og NT 1-8(■).

Kurven viser en god linearitet i det nedre konsentrasjonsområdet. Konsentrasjonene mellom 0,5 µg/ml og 15 µg/ml tilsvarer ekstraksjonsutbytter mellom 0,7 % og 21 % med en maksimal oppkonsentreringsfaktor på 50 ved utbytte på 100 %. Funksjonen for de rette linjene viser at linjene også her krysser y-aksen nær origo.

Presisjon av retensjonstid

Presisjon av analyseresultatene ble beregnet med utgangspunkt i retensjonstidene (t_R) til peptidene. Data er samlet fra 4 forskjellige dager der hvert peptid ble analysert 3 ganger hver dag, til sammen 12 analyser av hvert peptid. Tabell 6-3 viser et gjennomsnitt av retensjonstidene fra målingene. I tillegg vises det relative standardavviket av målingene innen en dag, repeterbarhet (intra-dag), og det relative standardavviket mellom dagene, inter-dag presisjon.

Tabell 6-3 Repeterbarhet og intermediær presisjon for retensjonstidene til peptidene i HPLC.

Peptid	t_R	Intra-dag (n=3) RSD (%)	Inter-dag (n=4) RSD (%)
Neurotensin 1-6	10,43	0,59	6,00
Neurotensin 1-8	15,58	0,43	2,40
Neurotensin	23,70	0,83	1,67

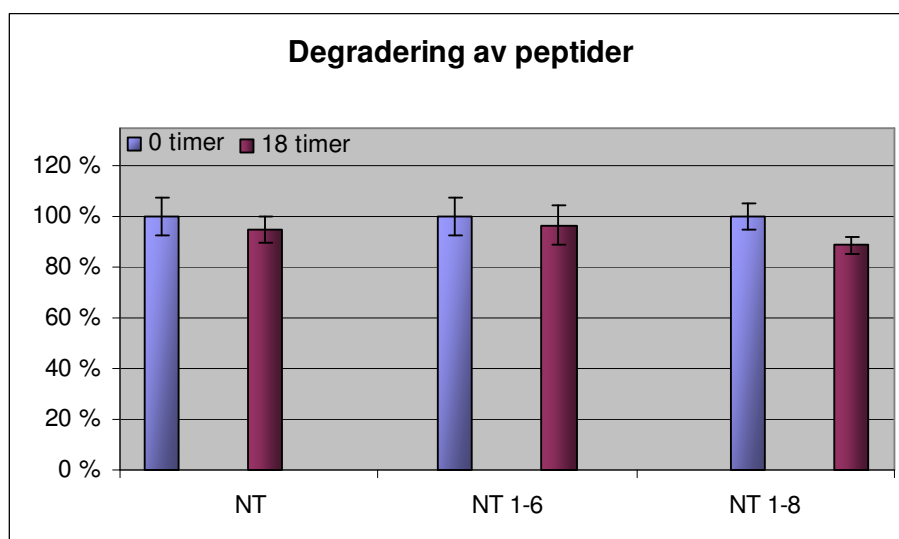
Repeterbarheten for alle tre peptidene er bra og viser liten variasjon innen hver enkelt dag. Inter-dag presisjonen er imidlertid noe høyere særlig for neurotensin 1-6. En forklaring på dette kan være at NT 1-6 eluerer tidlig i gradienten og vil være mer utsatt for variasjoner da t_R ligger nær den isokratiske delen av kromatogrammet. I tillegg vil det alltid være større variasjoner fra dag til dag enn innen en enkelt batch. For å redusere usikkerheten ble det hver dag analysert referanseløsninger av peptidene. Konklusjonen er derfor at metoden er stabil og egner seg godt til separering og kvantifisering av peptidene.

Presisjon av topphøyder

Presisjonen av intensiteten til signalet fra de tre peptidene ble beregnet ved å måle høydene på de enkelte toppene. 3 referanser ble analysert hver dag på 4 ulike dager, til sammen 12 analyser. Repeterbarheten (intra-dag) viste variasjoner mellom 1,0 % og 4,9 % for de tre peptidene. NT 1-6 viste størst variasjon, noe som ikke er uventet da den eluerte nær den isokratiske delen av gradienten. Inter-dag variasjonen lå mellom 9,2 % og 14,7 %. Også her viste NT 1-6 størst variasjon. For å redusere usikkerheten ble det analysert referanseløsninger av peptidene hver dag.

Stabilitet

Peptidene ble analysert umiddelbart og etter henstand i 18 timer ved pH 0,77 i romtemperatur.

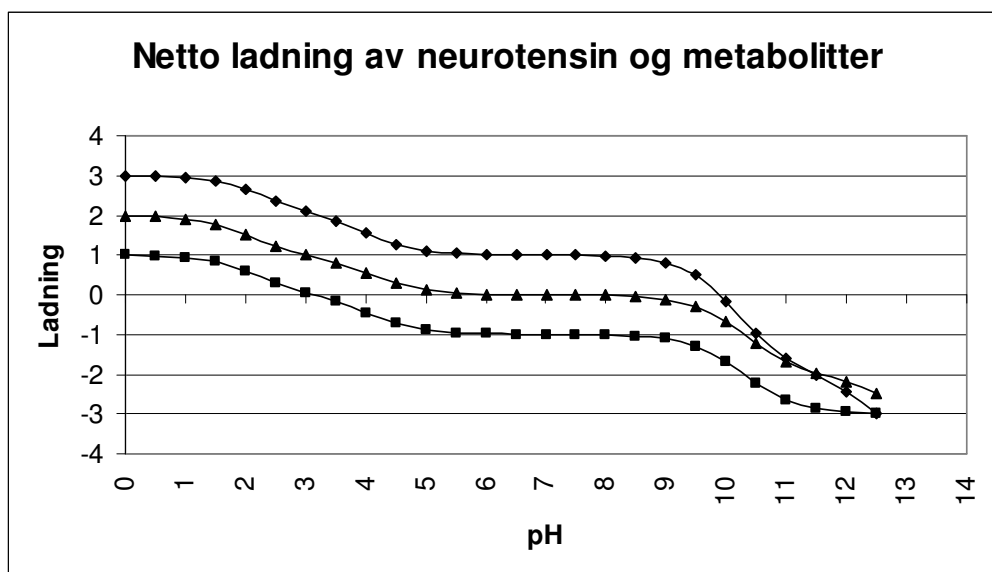


Figur 6-4 Degradering av neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8 ved henstand i 0,2 M HCl i romtemperatur i 18 timer.

Av figur 6-4 fremgår det at degraderingen av peptidene skjer til en viss grad. Peptidene ble ikke utsatt for lavere pH-verdier enn 0,77 under ekstraksjon. En ekstraksjon varer i 45 minutter og peptidene ble følgelig ikke utsatt for så lave pH-verdier lenger enn dette. I løpet av ekstraksjon og analyse blir det derfor trolig degradert mindre peptid enn i dette forsøket. At dette skal påvirke ekstraksjonen på noen annen måte enn noe redusert bytte er derfor lite sannsynlig. Det ble ikke observert andre produkter i kromatogrammet.

6.2 PRØVEOPPARBEIDELSE (LPME)

I biologiske prøver vil peptider befinne seg i en matriks av andre stoffer med ulike egenskaper. Det er derfor ønskelig å utvikle en selektiv prøveopparbeidelse der ekstraktet inneholder peptidet i høyest mulig konsentrasjon og lite forurensinger. Det har tidligere blitt utviklet en metode for prøveopparbeidelse av små modellpeptider i vann ved hjelp av LPME[6]. Med utgangspunkt i resultatene fra arbeidet, ble metoden videreutviklet ved bruk av større peptider. 1-heptansulfonsyre ble valgt som ionpardanner da denne har vist gode resultater på modellpeptidene[6]. Den har en kjede på 7 karbonatomer og er hydrofob, men samtidig vannløselig da den er ionisert i pH-området som ble brukt. Disse egenskapene er viktige for å kunne danne et hydrofobt ionpar med peptidet som kan krysse den organiske membranen. Ekstraksjonen ble foretatt ved sur pH. Dette er for at basiske grupper skal være i ionisert form for å kunne danne ionpar med sulfonsyren. Karboksylsyregruppene i sidegruppene vil samtidig være uioniserte (pK_a 4,25, se tabell 5-2), mens den terminale karboksylgruppen vil være delvis ionisert med en pK_a -verdi på 2,36. Som det fremgår av figur 6-5 bør pH være lav for å beholde netto positiv ladning av peptidene.

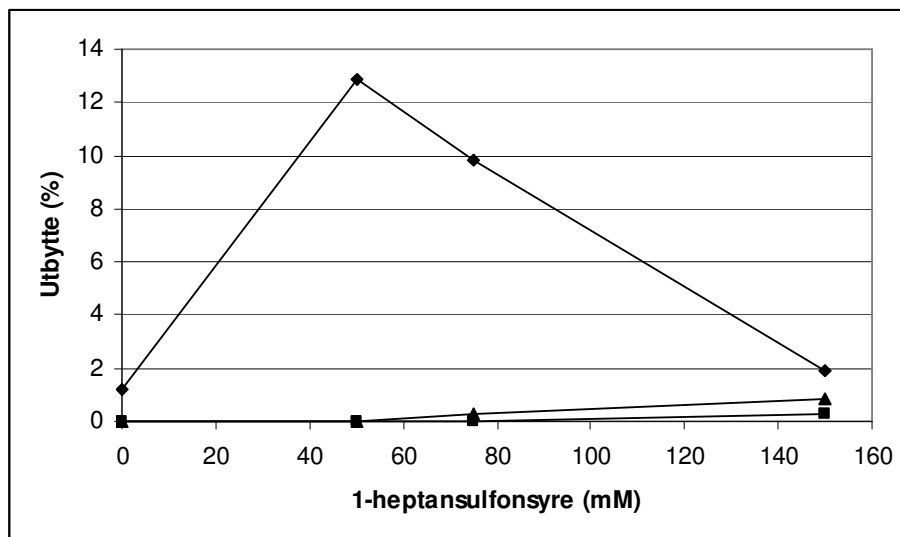


Figur 6-5 Netto ladning av neurotensin (♦), NT 1-8 (▲) og NT 1-6 (■) ved ulike pH-verdier.

6.2.1 Endringer foretatt i donorfase

6.2.1.1 Ulike konsentrasjoner av ionpardanner (1-heptansulfonsyre)

For å kunne gå over i organisk fase i særlig grad, er det nødvendig å bruke en ionpardanner for å danne et hydrofobt kompleks som kan krysse den organiske membranen. Det er viktig at konsentrasjonen av ionpardanneren er riktig. For lav konsentrasjon vil føre til at færre molekyler ionpardanner vil binde til peptidet. Peptidet uten motion vil være for hydrofilt til å kunne krysse den organiske membranen. Er konsentrasjonen for høy er det en risiko for at komplekset blir for hydrofobt og kan bli sittende igjen i organisk fase eller felle ut i donor- og akseptorfase. Konsentrasjonene av 1-heptansulfonsyre som ble valgt var; 0 mM, 50 mM, 75 mM, 150 mM og 300 mM. Akseptorfase med 300 mM ble ikke analysert, da den var sterkt blakket etter ekstraksjon. En tilsvarende blakking ble også observert i donorfase. Dette kan skyldes utfelling av sulfonsyren, da konsentrasjonen er høy og sannsynligvis nærmer seg metningspunktet i løsningen. En annen forklaring kan være at den høye konsentrasjonen av sulfonsyre vil trekke noe av den organiske fasen ut av fiberen. Med høy nok konsentrasjon av sulfonsyre kan en risikere at noe av den organiske fasen blir emulgert i donorfase og dette vil gi blakking. Volum av donorfase var i dette forsøket 1,5 ml. Utbyttet er derfor ikke direkte sammenlignbart med senere forsøk der volumet var forskjellig.

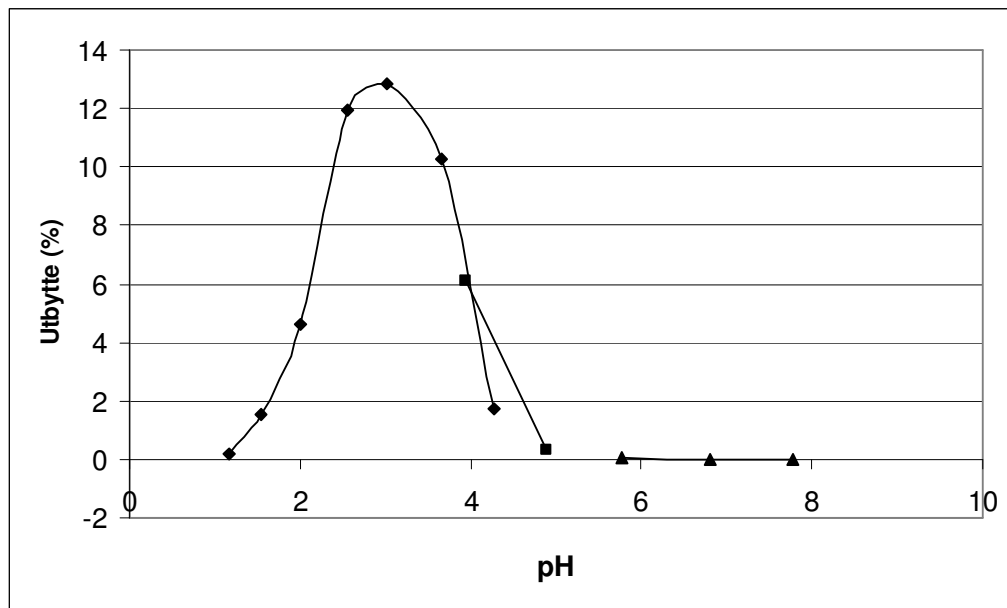


Figur 6-6 Ulike konsentrasjoner av 1-heptansulfonsyre i donorfase. Figuren viser ekstraksjonsutbytter av neurotensin (◆), NT 1-6 (■) og NT 1-8 (▲). Konsentrasjon av HCl var 0,01 M i alle donorfase. Volum donorfase: 1,5 ml.

Figur 6-6 viser at neurotensin har et optimalt utbytte ved bruk av 50 mM ionpardanner. Økende mengde sulfonsyre gav ikke økt utbytte. Dette er trolig på grunn av at komplekset blir for hydrofobt og blir sittende igjen i organisk fase. Neurotensin er forholdsvis hydrofob i utgangspunktet. Dette bekreftes ved et utbytte på over 1 % uten bruk av ionpardanner. Metabolittene NT 1-6 og NT 1-8 gav derimot ikke utbytte uten ionpardanner. De er langt mer hydrofile enn neurotensin. I tillegg er antall bindingssteder for ionpardanner færre. Neurotensin 1-6 har en positiv ladning, følgelig kan bare ett sulfonsyremolekyl binde seg til ett peptid. Selv med 150 mM ionpardanner var utbyttet mindre enn 1 %. For neurotensin 1-8 er utbyttet med samme konsentrasjon ionpardanner noe høyere. Dette peptidet har to positive ladninger som sulfonsyre kan binde til. Komplekset blir derfor mer hydrofobt ved høy nok konsentrasjon av ionpardanner. Felles for begge metabolittene var at utbyttet økte når konsentrasjonen av ionpardanner økte. Konsentrasjon på 50 mM av 1-heptansulfonsyre gav best ekstraksjonsutbytte av neurotensin. Selv om denne konsentrasjonen ikke var optimal for utbyttet av NT 1-6 og NT 1-8, var gevinsten av å øke konsentrasjonen så liten at 50 mM ble valgt å jobbe med videre.

6.2.1.2 Ulike pH-verdier

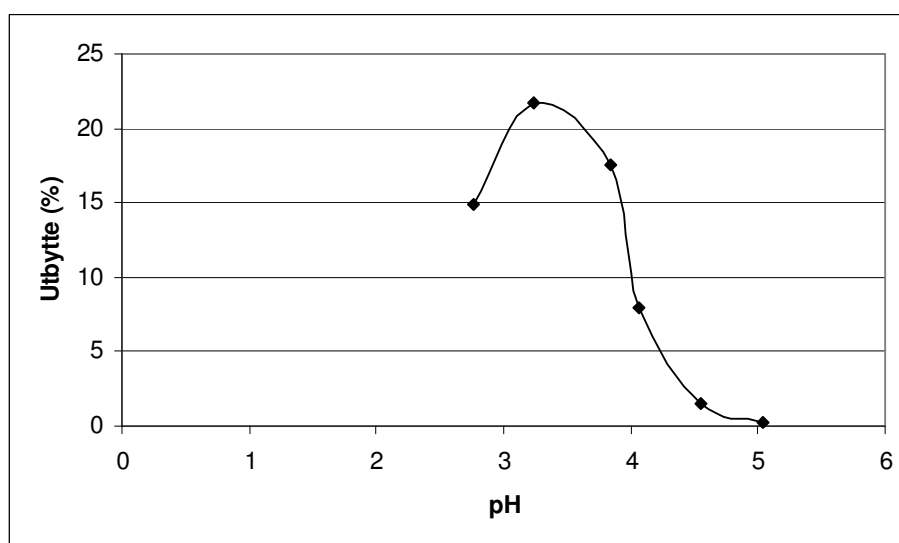
Surhetsgrad i donorfase ble variert for å se effekten dette ville ha på utbyttet. For å få færrest mulig variable ble 1-heptansulfonsyre benyttet som ionpardanner under alle forsøkene. I tillegg var akseptorfase 0,01 M HCl i alle forsøkene. I pH-området mellom 1 og 3,5 ble HCl benyttet til å justere pH, men ved høyere pH-verdier ble buffere benyttet for å oppnå en stabil pH. Figur 6-7 viser ekstraksjonsutbytter av neurotensin ved ulike pH-verdier i donorfase.



Figur 6-7 Ekstraksjonsutbytte av Neurotensin fra donorfaser med ulike pH-verdier ved bruk av HCl (♦), acetatbuffer (■) og fosfatbuffer (▲). Volum donorfase: 1,5 ml.

Neurotensin hadde et optimalt ekstraksjonsutbytte ved pH 3. Utbyttet ble tydelig redusert ved å gå opp eller ned en pH-enhet. Ved økende pH vil karboksylgruppene til peptidene bli deprotonert. Dette fører til at komplekset av peptid og ionpardanner blir langt mer hydrofilt, i tillegg vil en kunne oppleve at de negative ladningene til peptidet i større grad frastøter sulfonsyren. Resultatet blir økt løselighet av peptidet i donorfase og mindre affinitet for den organiske fasen. Transport av peptidet over membranen kan se ut til å være avhengig av en fluks av protoner fra akseptor- til donorfase. Resultatene viser at transporten begrenses og utbyttet blir mindre når pH synker. En annen forklaring kan være at log D verdien til 1-heptansulfonsyre er pH-avhengig (beregnet ved hjelp av ACD/Chemsketch[36]). Ved pH under 3 øker log D med synkende pH og er -0,29 ved pH 1. Dette fører til at mer av sulfonsyren vil befinne seg i den organiske fasen og ikke vil være tilgjengelig til å danne

ionpar med peptidene. Denne effekten vil forsterkes ved synkende pH i donorfase. For NT 1-6 og NT 1-8 har kurvene lik struktur, men toppen er ved pH 2 for NT 1-8 og pH 2,5 for NT 1-6. Utbyttene er små for begge peptidene og resultatene bør ikke legges for stor vekt på da usikkerheten er stor ved så lave konsentrasjoner. Citratbuffer ble også forsøkt i et større pH-område. Dette forsøket ble utført med donorfaser på 1 ml, de andre forsøkene ble utført med donorfase på 1,5 ml. Utbyttene er derfor ikke direkte sammenlignbare, men formen på kurven vil likevel kunne sammenlignes. Som vist senere øker utbyttet når faseforholdet mellom akseptor- og donorløsning blir mindre. Figur 6-8 viser utbyttet av neurotensin ved ulike pH-verdier laget med citratbuffer.

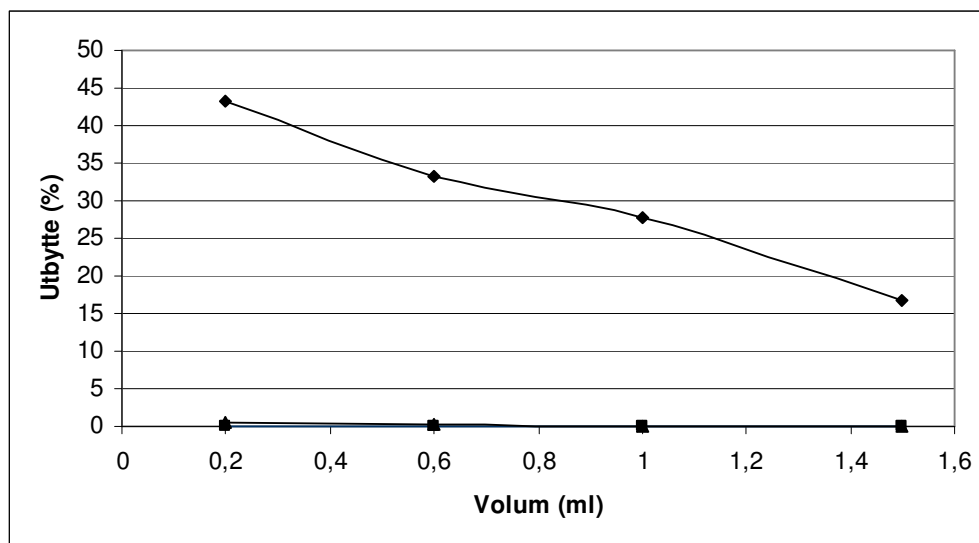


Figur 6-8 Ekstraksjonsutbytte av Neurotensin fra donorfaser med ulike pH-verdier laget med citratbuffer (◆). Volum donorfase: 1,0 ml.

Resultatene viser den samme tendensen for neurotensin som ved bruk av acetat-, fosfatbuffer og HCl. pH-optimum er her ved pH 3,2. Dette er en høyere pH-verdi enn i figur 6-7. En forklaring kan være at pH-verdiene ikke er målt tett nok til å gi et nøyaktig toppunkt, og dermed blir ulikt i de to forsøkene. På bakgrunn av forsøkene ble det bestemt å bruke en donorfase med pH 3 videre.

6.2.1.3 Ulike volumer

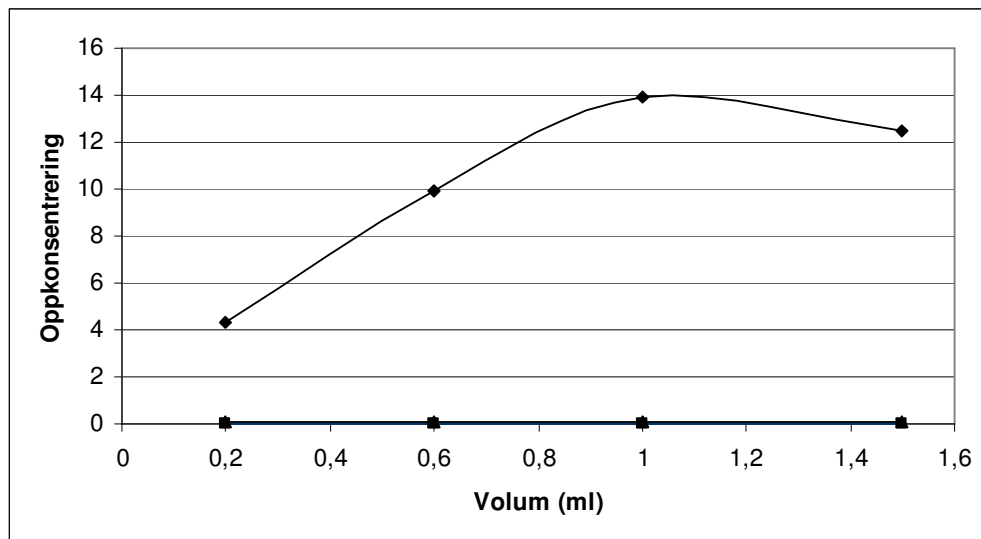
Det ble tidlig observert at volumet av donorfase hadde stor påvirkning på utbyttet av ekstraksjonene. For å se nærmere på denne sammenhengen, ble det utført forsøk med fire ulike volumer av donorfase, men konstant volum av akseptorfase (20µl).



Figur 6-9 Ekstraksjonsutbytter av neurotensin (◆), NT 1-8 (▲) og NT 1-6 (■) fra donorfaser med ulike volumer.

Figur 6-9 viser at utbyttet var størst når faseforholdet mellom donorfase og akseptorfase var minst. Utbyttet reduseres proporsjonalt med økning i volum av donorfase. Denne sammenhengen er lettest å se for neurotensin, da utbyttene for metabolittene foreløpig var så marginale at det er vanskelig å oppfatte slike trender. Ved å redusere volumet i donorfase vil analyttene få kortere diffusjonsvei, og vil dermed bruke kortere tid på å diffundere gjennom donorfase til hulfiberen. Det har tidligere blitt vist at dette kan redusere ekstraksjonstidene fra vann[4]. Ved å øke ekstraksjonstiden vil en kunne anta at utbyttene vil kunne øke med større volum, da det tar lenger tid å ekstrahere en større mengde molekyler. Dette er imidlertid avhengig av flere faktorer. Blant annet vil en ved økende konsentrasjoner kunne oppleve en metning av bærerkapasiteten til ionpardonneren. Det finnes i øyeblikket ingen matematiske modeller som beskriver dette systemet og mer grunnleggende forskning må gjøres for å få klare svar. For å bare studere diffusjonsveiens påvirkning av utbyttet, vil det være aktuelt å gjøre et forsøk med en fast mengde analytt som blir fortynnet til ulike volumer. Hvor effektivt væskelaget rundt fiberen blir byttet ut ved hjelp av risting, er en viktig enkeltfaktor her.

Et annet moment som er aktuelt når ulike volumer blir vurdert, er grad av oppkonsentrering. Større faseforhold mellom akseptor- og donorfase vil kunne gi større teoretisk oppkonsentrering.

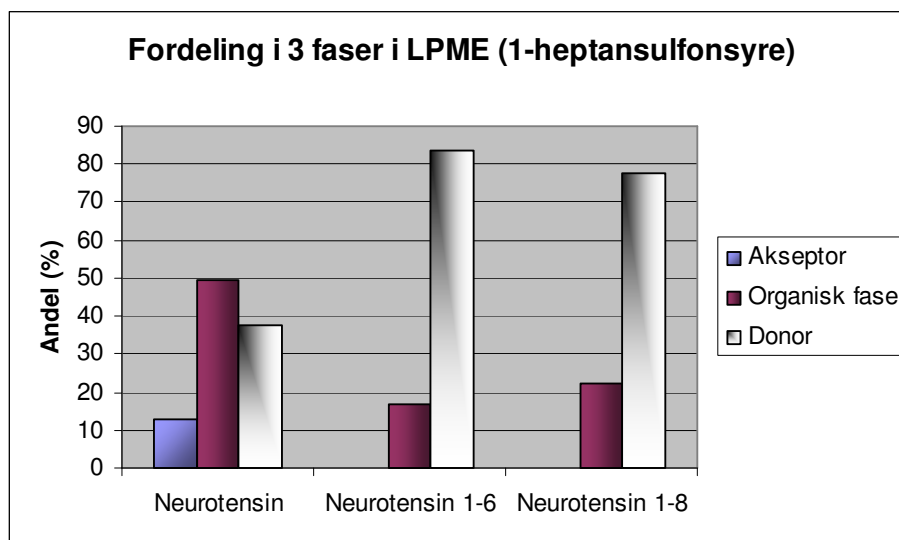


Figur 6-10 Figuren viser oppkonsentrering av peptidene fra donorfaser med ulike volumer.

Figur 6-10 viser at oppkonsentrering øker proporsjonalt med volum av donorfase. Det ser imidlertid ut til at denne utviklingen stagnerer når volumet når en viss størrelse. Om det er en usikkerhet i forsøket eller en reell effekt bør undersøkes i fremtidige forsøk. Volumet som ble valgt å jobbe med videre var 1 ml. Dette ble valgt på grunnlag av at det gir god maksimal oppkonsentrering på samme tid som ekstraksjonsutbyttet er akseptabelt. En god oppkonsentreringsfaktor er et nyttig verktøy når små konsentrasjoner fra en gitt matriks skal analyseres.

6.2.1.4 Ulike ionpardannere

Effekten av ulike ionpardannere på utbyttet har blitt prøvd. Noe av problemet er at komplekset mellom 1-heptansulfonsyre og peptid ikke blir hydrofobt nok til å gå over i organisk fase. For å få et bedre inntrykk av hvordan peptidene fordelte seg i systemet med gjeldende betingelser (pH 3, 50 mM 1-heptansulfonsyre i donorfase; 1-oktanol som organisk fase og 0,01 M HCl som akseptorfase), ble donorfase analysert. Ligningene i kapittel 5.4.5 ble brukt til å beregne fordelingen av peptidene i de 3 fasene som vist i figur 6-11.



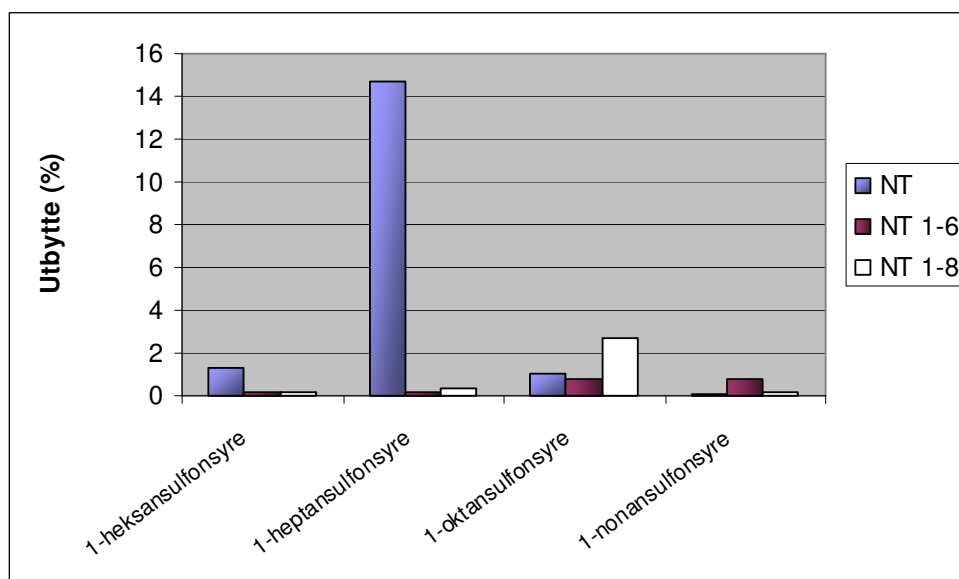
Figur 6-11 Fordeling av peptidene i de 3 ulike fasene i LPME ved bruk av 1-heptansulfonsyre.

I tilfellet neurotensin ser man at mindre enn 40 % av peptidet er igjen i donorfase. Komplekset av peptid og ionpardanner er hydrofobt og vil ha høy affinitet for den organiske fasen der mesteparten av peptidet befinner seg. En av utfordringene her vil være å få effektivisert utbyggingen av peptid fra sulfonsyre mellom organisk fase og akseptorfase. NT 1-6 og NT 1-8 finner man i all hovedsak igjen i donorfase på grunn av manglende hydrofobisitet.

Ulike ionpardannere i surt miljø

Nye ionpardannere med forskjellige egenskaper ble prøvd ut for å gi et kompleks som hadde større affinitet for den organiske fasen. Alle ionpardannerene var sulfonsyrer. Kjedelengder varierte fra 6 til 9 karbonatomer. I tillegg ble 2,4-dinitrobenzensulfonsyre og 6-hydroksey-2-naftalensulfonsyre prøvd som ionpardanner. Disse sulfonsyrene har andre egenskaper enn de

rettkjededde og muligheten for å få andre interaksjoner med peptidet vil være til stede. Dette vil særlig være aktuelt for metabolittene der antall positive ladninger er få.



Figur 6-12 Sulfonsyrer med ulike kjedelengder (C_6 - C_9) som ionpardannere. Konsentrasjon av HCl var 0,001 M HCl i alle donorfasene.

Som figur 6-12 viser gav 1-heptansulfonsyre et tydelig optimum i utbytte for neurotensin. Kortere kjeder gir trolig et kompleks som ikke er hydrofobt nok til å gå over i organisk fase i tilstrekkelig grad. Med kjeder på 8 og 9 karbonatomer vil komplekset ha for stor affinitet for organisk fase i forhold til akseptorfase, mesteparten vil trolig være igjen i organisk fase og lite peptid finnes i akseptorfase. Neurotensin 1-8 fikk et markert høyere utbytte ved bruk av 1-oktansulfonsyre som ionpardanner. Dette er sannsynligvis på grunn av at et mer hydrofobt kompleks blir dannet og mer av peptidet går over i organisk fase. Ytterligere økning av kjedelengde gav derimot ikke større utbytte. Dette kan ha forklaring i forsåping av ionpardanneren som vil kunne skje når karbonkjeden blir for lang. Miceller vil da kunne dannes i stedet for det ønskelige komplekset mellom peptid og ionpardanner. For NT 1-6 økte utbyttet med økende kjedelengder opp til 8 karbonatomer. Dette er det mest hydrofile peptidet av de tre og det er derfor ikke overraskende at utbyttet var mindre enn for de to andre. Med kun én positiv ladning vil det bare være mulig å binde til ett molekyl ionpardanner og derfor vil størrelsen på komplekset være begrenset. Forsøkene med 2,4-dinitrobenzensulfonsyre og 6-hydroksy-2-naftalensulfonsyre gav ikke utbytte for noen av peptidene. I tillegg var kromatogrammene vanskelige å tolke på grunn av mye støy forårsaket av sidegruppene til

ionpardanneren som har mye konjugerte dobbeltbindinger og vil derfor absorbere UV. 1-heptansulfonsyre ble valgt å bruke videre da denne viste gode utbytter, særlig for neurotensin. Det ble også bestemt å gjøre flere eksperimenter med 1-oktansulfonsyre parallelt da denne viste lovende egenskaper som ionpardanner i systemet.

Ulike ionpardannere i basisk miljø

Et annet alternativ ved bruk av motion i LPME-systemet, er å bruke basiske ionpardannere. De negativt ladede gruppene på peptidet blir da benyttet til å binde til de positive ladningene på de basiske ionpardannerene. Siden den terminale aminogruppen på neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8 har ringstruktur og ikke har ladning, vil det kunne være fordelaktig å benytte seg av de negative ladningene da den terminale karboksylgruppen er ladet på alle peptidene. Forsøket ble utført i en basisk donorfase med pH 13. Som det fremgår av figur 6-5 er høy pH nødvendig for å eliminere de positive ladningene på peptidet og lage et overskudd av negative ladninger. Akseptorfasen som ble brukt var 0,01 M HCl (pH 2). Peptidet vil være positivt ladet i surt miljø og dermed være løselig i akseptorfasen. Ionpardannerene som ble valgt var kvartære ammoniumforbindelser med ulike kjedelengder. Disse var positivt ladet i hele pH-området som ble brukt. Ammoniumionene hadde fire ulike karbonkjeder bundet og totalt antall karbonatomer er vist i tabell 6-4.

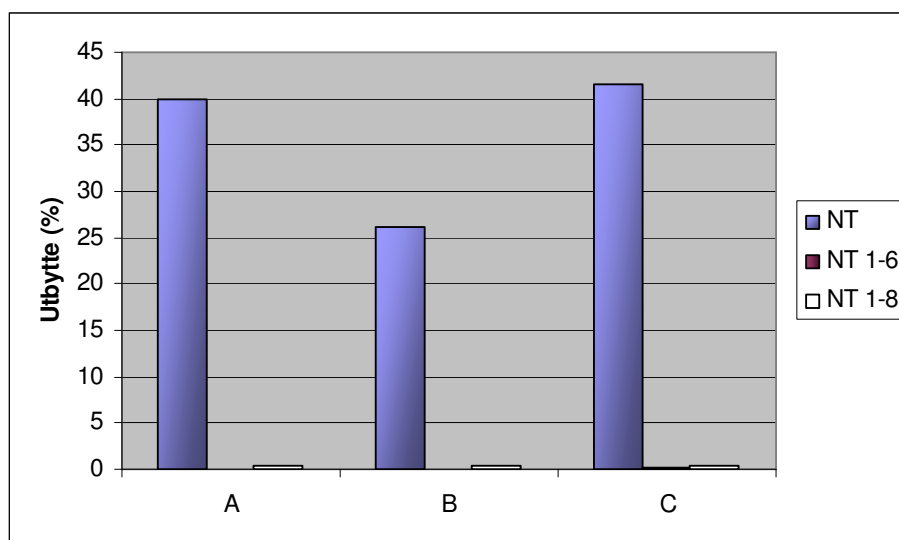
Tabell 6-4 Kjedelengder av basiske ionpardannere.

Ionpardanner	Kjedelengde
Dodecyldimetylammoniumbromid	16 karbonatomer
Dodecyltrimetylammoniumbromid	15 karbonatomer
Tetrapropylammoniumklorid	12 karbonatomer
Tetraetylammoniumbromid	8 karbonatomer

Dodecyldimetylammoniumbromid og dodecyltrimetylammoniumbromid viste tendenser til forsåpning ved utblanding i vann. En kombinasjon av lange karbonkjeder og for høy konsentrasjon av ionpardanner fører til at den kritiske micellekonsentrasjonen blir nådd. Disse ionpardannerene var for hydrofobe, gav utfelling i akseptorfasen og ble følgelig ikke analysert på HPLC. Bruk av tetrapropylammoniumklorid og tetraetylammoniumbromid gav ikke ekstraksjonsutbytter for noen av peptidene.

Tilsetning av både en negativ og positiv ionpardanner til donorfase

For å øke hydrofobisiteten av et kompleks sammensatt av peptid og ionpardanner, ble det gjort forsøk med både en negativ og en positiv ionpardanner tilsatt til donorfase. Tidligere forsøk viste at det kunne være vanskelig å få til hydrofobe nok komplekser av NT 1-6 og 1-8 ved bruk av bare en ionpardanner. Tilsetning av et positivt motion i tillegg vil både kamuflere negative ladninger samtidig som det kan gjøre komplekset mer hydrofobt. De positive motionene som ble valgt var ammoniumklorid som i hovedsak vil kamuflere negative ladninger, og tetraetylammoniumbromid som både kamuflerer negative ladninger og danner et mer hydrofobt kompleks. Konsentrasjonen av HCl i donorfase var 0,01 M HCl. pK_a -verdien til den terminale karboksylgruppen hos alle de tre peptidene er 2,36 og følgelig vil mesteparten av molekylene være ladet. Akseptorfase som ble brukt var 0,1 M HCl noe som fører til en forskjell i konsentrasjon av H^+ -ioner fra akseptor- til donorfase. Forsøket ble utført ved å lage en donorfase med den negative ionpardanneren (1-heptansulfonsyre) og peptidblandingen. Denne ble plassert på vibrerende rotering i 25 minutter for å forsikre seg om at det var dannet kompleks av ionpardanner og peptid. Det positive motionet ble deretter tilsatt og ekstraksjonen gjort ferdig. Et overskudd av positivt motion ble tilsatt for å hindre at ionet kun ville felle ut med ubundet sulfonsyre. Figur 6-13 viser ekstraksjonsutbyttene for de ulike peptidene.



Figur 6-13 Tilsetning av både en positiv og en negativ ionpardanner til donorfase.

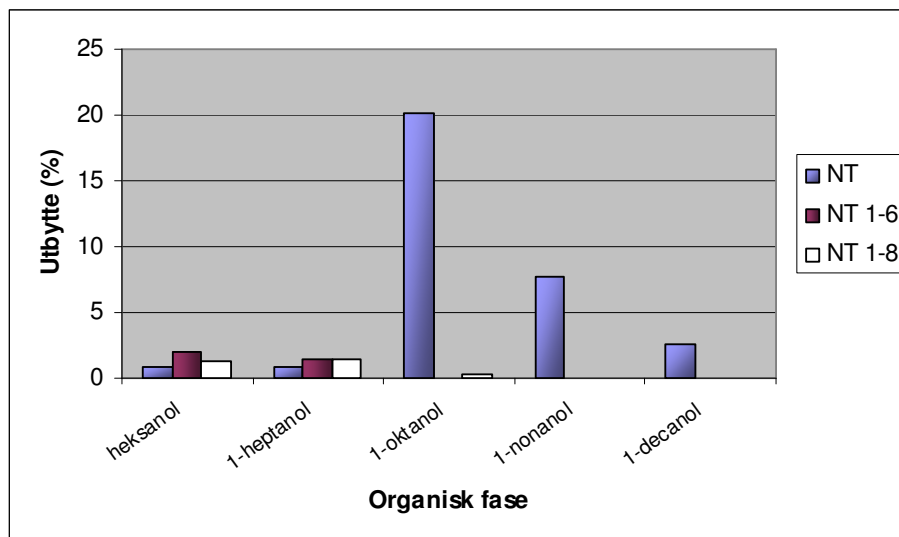
A: 0,1 M HCl, B: 0,1 M HCl + 0,2 M Tetraetylammoniumbromid, C: 0,1 M HCl + 0,2 M NH₄Cl.

Effekten på NT 1-6 og 1-8 var vanskelig å tolke, da ekstraksjonsutbyttene var svært små. Konklusjonen må likevel bli at tilsetning av et positivt motion ikke påvirker utbyttene i særlig

stor grad. Tilsetning av tetraetylammoniumbromid reduserte ekstraksjonsutbyttet av neurotensin. Det kan tenkes at tilsetning av et så stort positivt ladet ion gjør et allerede hydrofobt neurotensinkompleks for hydrofobt til å kunne ekstraheres ut i akseptorfasen. Resultatet kan være at komplekset i hovedsak er igjen i den organiske fasen. En liten økning i utbyttet ble imidlertid registrert ved tilsetning av ammoniumklorid til donorfasen. Her kan flere forklaringer være aktuelle. Som nevnt før kan ammoniumionet maskere den negative ladningen til den terminale karboksylgruppen på peptidet. Alternativt kan økningen skyldes en utsaltingseffekt, som vil gjøre peptidet mindre løselig i donorfasen. På tross av en liten økning i utbyttet ble prosessen med å tilsette to ionpaddere vurdert som for arbeidskrevende i forhold til utbyttet som ble oppnådd. Derfor ble det valgt å kun bruke en type ionpadder videre i oppgaven.

6.2.2 Endringer foretatt i organisk fase

Uprøving av ulike organiske faser viste at løsningsmiddelet som fyller porene i fiberen var av stor betydning for ekstraksjonsutbyttet av peptidene. Når ionpaddere benyttes i LPME-systemet, begrenser det alternativene for valg av organisk løsningsmiddel, men alkoholer har vist å gi høye utbytter[34]. Mer hydrofobe organiske faser vil øke selektiviteten av ekstraksjonen og gi økt affinitet for hydrofobe substanser. Det er samtidig viktig at løsningsmiddelet ikke er blandbart med vann for å gi en effektiv ekstraksjon med høy oppkonsentrering. Mer hydrofile organiske faser vil øke muligheten for å ekstrahere komplekser som er mindre hydrofobe, som i tilfellet NT 1-6 og NT 1-8. Ulempen er mindre selektivitet da flere substanser kan ekstraheres over. Figur 6-14 viser utbytte av peptidene ved ulike organiske faser.



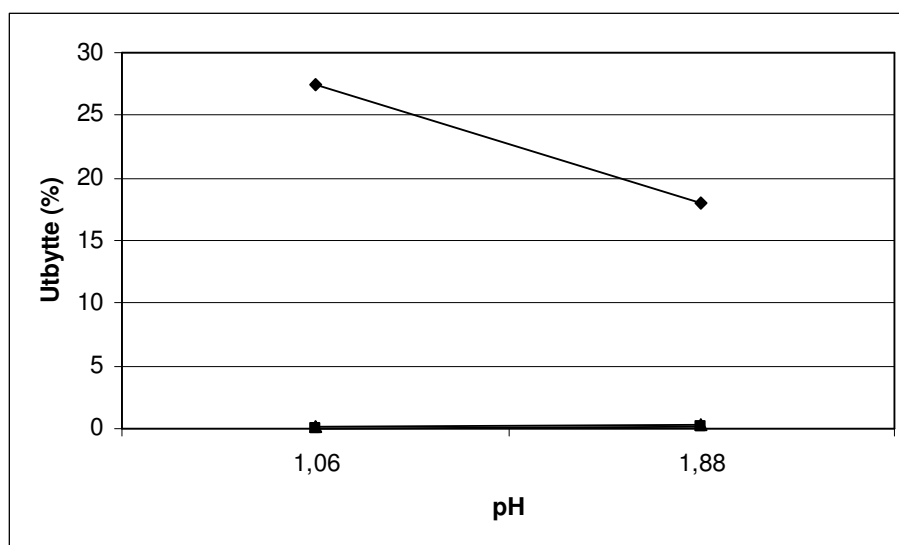
Figur 6-14 Figuren viser ekstraksjonsutbytter av peptidene med ulike organisk faser.

For neurotensin var 1-oktanol den organiske fasen som fungerte best, med ekstraksjonsutbytte på 20 %. Dette tilsvarer en oppkonsentreringsfaktor på 10. De mer polare løsemidlene 1-heptanol og heksanol var ikke gunstige for ekstraksjonen av neurotensin. Mer polare løsemidler førte til høyere utbytter for NT 1-6 og NT 1-8. Dette kan forklares ved at peptidene er mer hydrofile enn neurotensin. Det viste seg at heksanol ikke ble immobilisert på samme måte som de andre alkoholene og blandet seg med akseptorfase. Heksanol har derfor ikke gunstige egenskaper som organisk fase i LPME. Fordelingen av komplekset i organisk fase er sannsynligvis dårligere med langkjedede alkoholer på grunn av høy hydrofobisitet. 1-nonanol gav likevel 8 % utbytte av neurotensin. 1-nonanol og 1-dekanol var i tillegg svært viskøse og gav blakking av donorfase. Sannsynligvis kreves lenger vibrering på ultralydbad for å fjerne overskudd av organisk fase når så viskøse organiske faser benyttes. For høy viskositet er heller ikke gunstig for hastigheten av diffusjonen over den organiske membranen. 1-oktanol ble valgt å arbeide med videre da denne har egenskaper som er ønskelige som organisk fase i LPME og gav i tillegg gode ekstraksjonsutbytter.

6.2.3 Endringer foretatt i akseptorfase

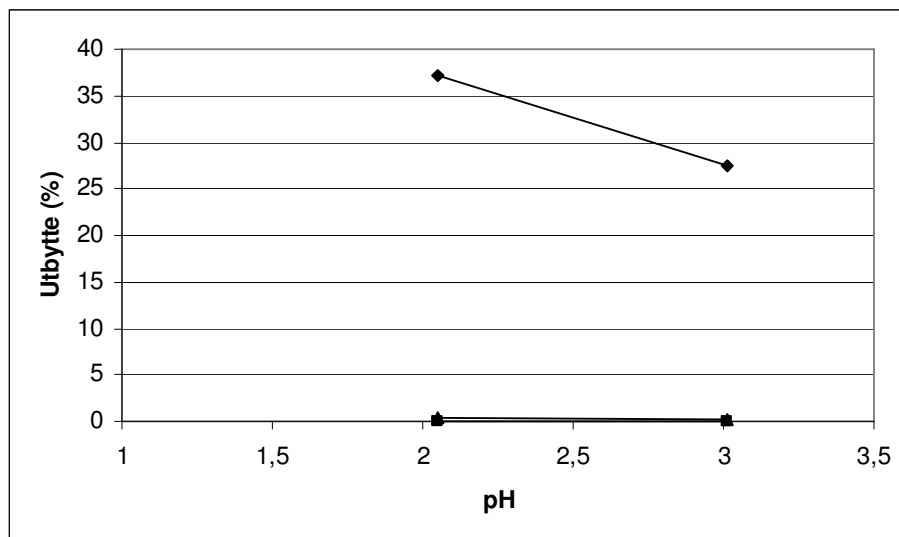
6.2.3.1 Ulike pH-verdier

Ved hjelp av løsninger med ulike konsentrasjoner av HCl, ble pH i akseptorfasen variert. Akseptorfasen var i utgangspunktet en løsning på 0,01 M HCl. For å finne ut mer om forskjell i protonkonsentrasjon fra donor- til akseptorfasen ville ha betydning for ekstraksjonen, ble det utført forsøk med lavere pH-verdier i akseptorfasen. Dette vil øke protongradienten mellom akseptorfasen og donorfasen og kunne tenkes å gi en mer effektiv ekstraksjon.



Figur 6-15 Variasjon av pH i akseptorfase. Figuren viser ekstraksjonsutbyttene for neurotensin (♦), NT 1-8 (▲) og NT 1-6 (■) Donorfase 0,001 M HCl, 50 mM 1-heptansulfonsyre.

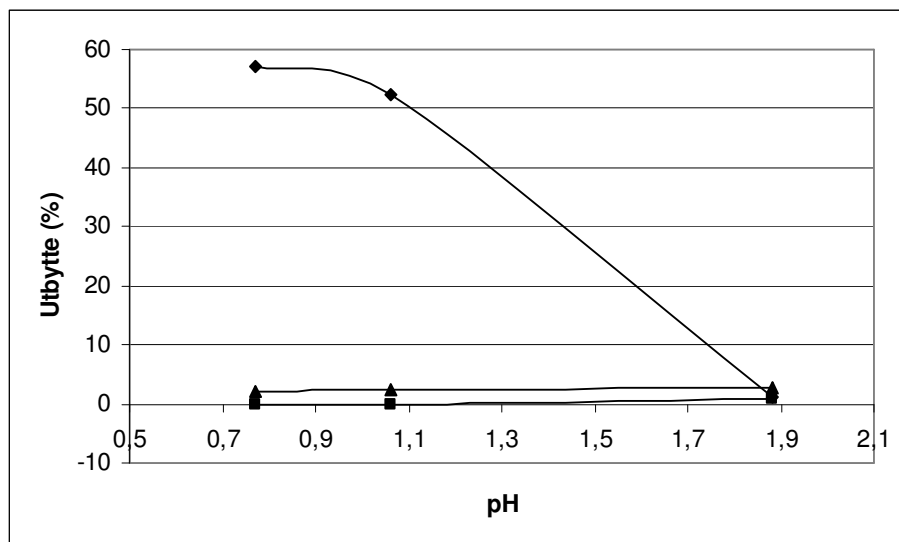
Som figur 6-15 viser øker ekstraksjonsutbyttet når pH i akseptorfasen blir mindre. Dette gir støtte til teorien om at forskjell i protonkonsentrasjon kan være en drivkraft bak ekstraksjon. For metabolittene er det liten forskjell i utbyttet fra de ulike akseptorfasene. Komplekset av peptid og ionpardanner er ikke hydrofobt nok til å gå over i den organiske fasen og blir ikke påvirket av protongradienten. Ser man på strukturen til peptidene vil en anta at de er mindre løselige i vann ved lavere pH. Reduksjon av pH i donorfasen vil kunne føre til mindre affinitet til donorfasen og økt overgang til den organiske fasen. Det ble derfor utført et forsøk med konstant konsentrasjon HCl i akseptorfasen, 0,1 M. Samtidig ble pH i donorfasen variert.



Figur 6-16 Variasjon av pH i donorfase. Figuren viser ekstraksjonsutbytter av neurotensin (♦), NT 1-8 (▲) og NT 1-6 (■) Akseptorfase: 0,1 M HCl.

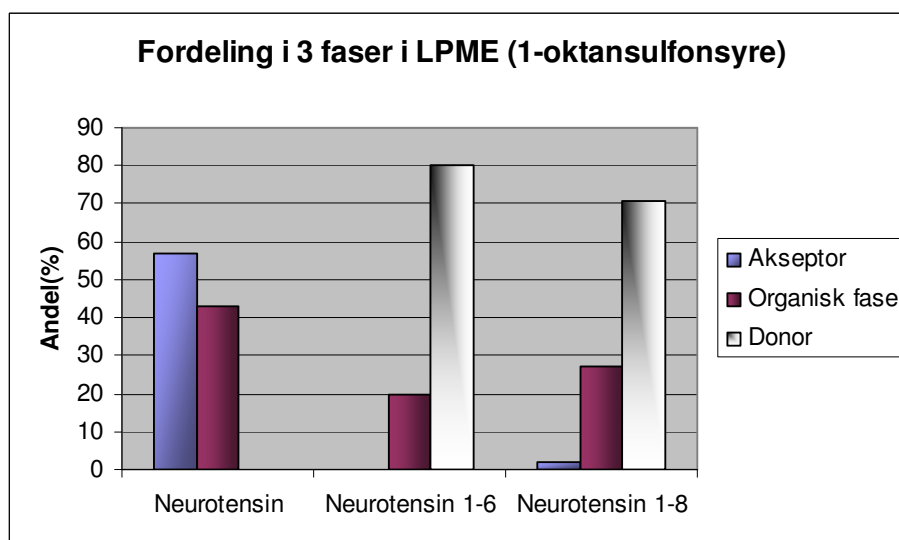
Figur 6-16 viser at ekstraksjonsutbyttet av neurotensin øker når pH i donorfasen blir lavere. Peptidet er ved pH 2 mindre løselig i vann enn ved pH 3 og vil derfor gå over i organisk fase i større grad. Siden pH i akseptorfasen fortsatt er lavere vil protongradienten være til stede for å kunne drive ekstraksjonen. For metabolittene var utbyttet fortsatt marginalt.

For å prøve å øke ekstraksjonsutbyttet for NT 1-6 og NT 1-8 ble det utført et nytt forsøk med 1-oktansulfonsyre som ionpardanner. Denne ionpardanneren vil kunne lage mer hydrofobe komplekser som kan gå over i organisk fase og viste i tidligere forsøk å gi bedre ekstraksjonsutbytter for NT 1-8. Ved å redusere pH i akseptorfasen var målet å kunne benytte seg av en større protongradient i kombinasjon med den økt hydrofobisiteten til komplekset. Forsøket ble utført med en donorfase bestående av ionpardanner og 0,001 M HCl (pH 2,94). Akseptorfaser helt ned mot pH 0 ble prøvd. Akseptorfase bestående av 1,0 M HCl førte til en rødbrun utfelling i ekstraktet og ble derfor ikke analysert videre på HPLC. Den sureste løsningen som ble analysert var 0,2 M HCl, pH 0,77.



Figur 6-17 Variasjon av pH i akseptorfase. Figuren viser utbytter av neurotensin (◆), NT 1-8 (▲) og NT 1-6 (■) Donorfase: 0,001 M HCl, 50 mM 1-oktansulfonsyre.

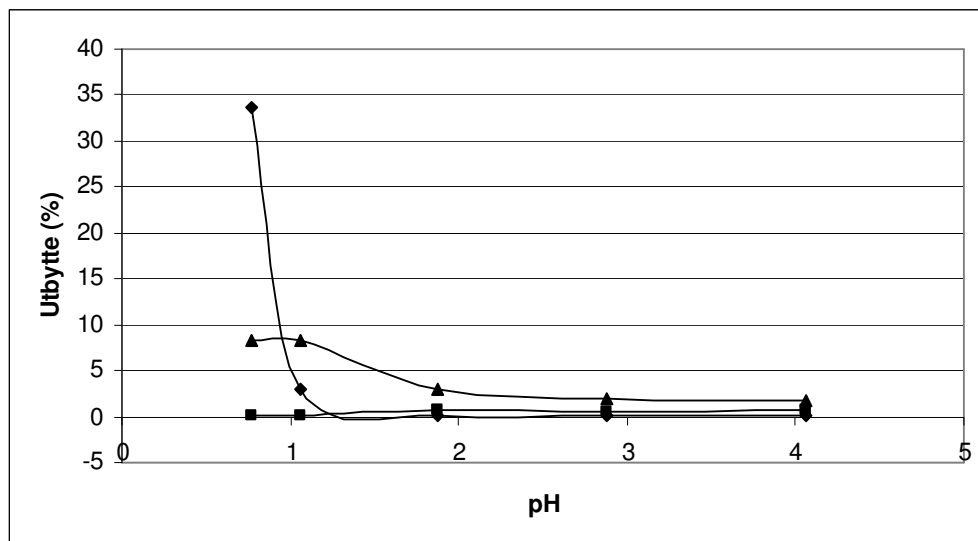
Figur 6-17 viser en markant økning i utbytte av neurotensin ved reduksjon av pH i akseptorfase. Ved å senke pH fra 1,88 til 0,77 oppnås en økning i utbytte fra 1 % til 57 % som tilsvarer en oppkonsentreringsfaktor på over 28. En forklaring til dette kan være en økt protongradient. For NT 1-8 varierer utbyttet mellom 2 og 3 %. Størst utbytte ble observert med akseptorfase på 0,01 M HCl. Variasjonene er ikke større enn at det kan skyldes tilfeldigheter. Tendensen er likevel den samme med NT 1-6. Her er det imidlertid bare observert resultater ved bruk av 0,01 M HCl akseptorfase.



Figur 6-18 Figuren viser fordeling av peptidene i de 3 fasene av LPME ved bruk av 1-oktansulfonsyre.

Figur 6-18 viser konsentrasjonsfordeling i de 3 ulike fasene i LPME. Den viser at neurotensin ikke finnes igjen i donorfase. Forsøkene med 1-heptansulfonsyre (figur 6-11) viser til sammenligning at nesten 40 % av peptidet er igjen i donorfase. Det er helt avgjørende for en vellykket ekstraksjon å få komplekset over i organisk fase, noe som illustreres av forskjellen i ekstraksjonsutbytte mellom forsøkene med 1-oktansulfonsyre og 1-heptansulfonsyre. For metabolittene viser figur 6-18 at noe mer går over i organisk fase ved bruk av en mer hydrofob ionpardanner. Gevinsten er mindre enn for neurotensin på grunn av færre bindingssteder for sulfonsyren.

Forsøkene med 1-heptansulfonsyre viste at det kunne være gunstig å redusere pH i donorfase for å øke ekstraksjonsutbyttet. Det ble derfor gjort forsøk med å benytte seg av 0,01 M HCl i donorfase med 1-oktansulfonsyre som ionpardanner. Et av målene med dette var å øke ekstraksjonsutbyttet av NT 1-6 og NT 1-8. For å belyse peptidenes oppførsel ved ulike pH-verdier i akseptorfasen, ble løsninger av HCl og ammoniumformiatbuffer med pH mellom 0,77 og 4,06 brukt som akseptorfasen. Siden høyere pH-verdier i akseptorfasen gir økt løselighet av peptidene ville et slikt forsøk også kunne gi svar på viktigheten av en protongradient.



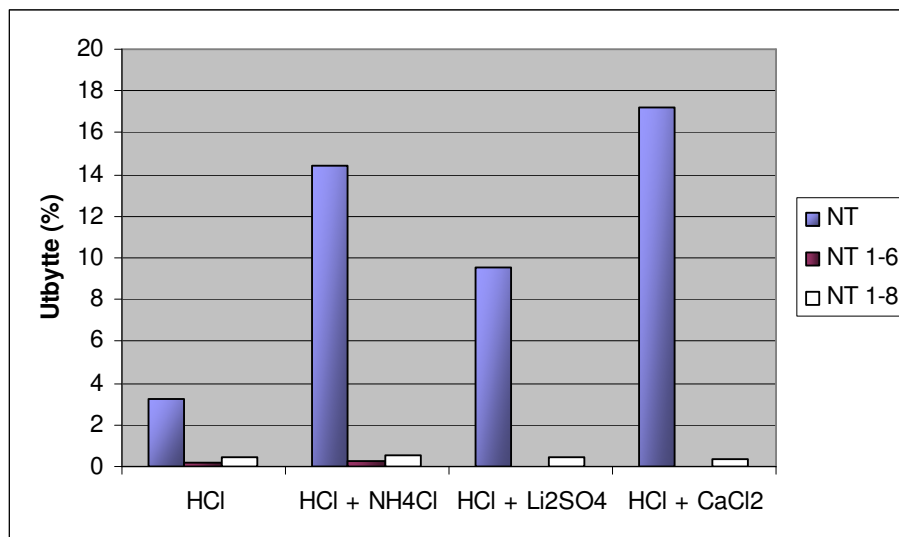
Figur 6-19 Variasjon av pH i akseptorfasen. Figuren viser utbytter av neurotensin (◆), NT 1-8 (▲) og NT 1-6 (■) Donorfase: 0,01 M HCl, 50 mM 1-oktansulfonsyre.

Som figur 6-19 viser gav reduksjon av pH i donorfase til 2, et utbytte av neurotensin 1-8 på over 8 %. Dette tilsvarer en oppkonsentreringsfaktor på litt over 4. Forklaringen kan være at løseligheten av peptidet i donorfase er mindre ved lav pH. Mer av peptidet vil derfor gå over i organisk fase og deretter akseptorfase. Figur 6-19 viser også at ekstraksjonsutbyttet avhenger av en lav pH i akseptorfase. Det synes derfor sannsynlig at ekstraksjonen er avhengig av en forskjell i konsentrasjon av protoner fra akseptorfase til donorfase. Utbyttet av neurotensin er lavt både i donorfase med 0,01 M HCl og 0,001 M HCl ned til en terskelverdi av pH der utbyttet plutselig øker. Andre drivkrefter bak ekstraksjonen kan også tenkes. Konsentrasjonsforskjellen av ionpardanner er stor mellom donor- og akseptorfase og vil kunne være en drivkraft bak ekstraksjonen. I tillegg vil den lave pH-verdien i akseptorfase gi en høyere log D-verdi for sulfonsyren enn i donorfase og høyere affinitet for den organiske fasen enn ved høyere pH[36]. Dette er sannsynligvis et resultat av at pH i akseptor vil nærme seg pK_a -verdien til sulfonsyren og kan føre til at fortrenging av peptidet fra ionpardanneren med H^+ -ioner vil gå lettere.

Metoden viser også en svært god selektivitet mellom de ulike peptidene. Ved å velge donorfase med pH 2 eller 3 og konstant pH 1 i akseptorfase kan ekstraksjon av henholdsvis neurotensin 1-8 eller neurotensin utføres. Ekstraksjonsutbyttet av neurotensin 1-6 er lavt under alle forhold. Dette er det mest hydrofile av peptidene og har ikke ideelle egenskaper til å ekstraheres i LPME-systemet.

6.2.3.2 Tilsetning av positive ioner til akseptorfase

Siden tidligere forsøk hadde vist at konsentrasjonen av protoner i akseptorfase var av betydning for ekstraksjonsutbyttet, ble det gjort forsøk med å tilsette andre positive ioner som kunne ha lignende effekt. Teoretisk sett vil positive ioner kunne binde til sulfonsyren i grenseflaten mellom organisk fase og akseptorfase. Den vil da fortrenge peptidet som er bundet til sulfonsyren og peptidet vil løse seg i akseptorfase. Ionene som ble brukt, Li^+ , Ca^{2+} og NH_4^+ , har lignende egenskaper og størrelse som hydrogen. For å eliminere protongradienten var konsentrasjonen av HCl lik i donor- og akseptorfase. Løsningene med de nye ionene ble laget slik at antall positive ladninger skulle være den samme i løsningene.



Figur 6-20 Tilsetning av positive ioner til akseptorfase. Konsentrasjon av HCl i akseptorfase var 0,01 M HCl. Donorfase: 0,01 M HCl, 50 mM 1-heptansulfonsyre.

Figur 6-20 viser at tilsetning av Ca^{2+} til akseptorfase gav best resultater for ekstraksjonsutbyttet av neurotensin med et utbytte på nesten 18 %. Dette er en kraftig økning i forhold til akseptorfase med bare HCl. Li^{+} var ionet som gav minst økning i utbytte, men alle ionene gav bedre ekstraksjonsutbytte for neurotensin enn bare HCl. Det er tydelig at ionene har ulik affinitet for 1-heptansulfonsyre og vil i ulik grad fortrenge peptidene. Tidligere eksperimenter har som nevnt antydnet at konsentrasjonsforskjell av protoner fra donor- til akseptorfase er av betydning for en vellykket ekstraksjon. Det kan i lys av dette forsøket også tenkes at høye konsentrasjoner av H^{+} -ioner i akseptorfase på samme måte som de andre positive ionene vil fortrenge peptidene lettere og forbedre utbyttet. Utslagene for metabolittene var små og ingen av peptidene viste ekstraksjonsutbytte av betydning.

6.2.4 Prøveopparbeidelse i urin

Etter mange forsøk på å øke ekstraksjonsutbyttet for peptidene, var tilfredsstillende oppkonsentrering av neurotensin samt akseptabel oppkonsentrering av neurotensin 1-8 oppnådd. Peptidene ble derfor forsøkt ekstrahert fra urin. Tidligere forskning har vist at neurotensin 1-8 finnes i urin[11]. Samtidig er det vist at intakt neurotensin sannsynligvis ikke vil være å finne i urin, men derimot i plasma der NT 1-8 også kan påvises[12]. I første omgang ble urin tilsatt en kjent mengde peptid forsøkt ekstrahert. Da urin inneholder høye konsentrasjoner av salter, ble prøvene fortynnet med donorfase før ekstraksjon. For å oppnå

riktig surhetsgrad av donorfase ble pH justert med 0,2 M HCl. Ekstraksjonsbetingelsene ble valgt slik at høyest mulig oppkonsentrering for neurotensin 1-8 var mulig samtidig som at neurotensin også kunne ekstraheres. pH 2 ble derfor valgt i donorfase, mens akseptorfase var 0,2 M HCl.

Tabell 6-5 Tabellen viser ekstraksjonsutbytter av peptidene fra urin.

Peptid	Utbytte ved ulike konsentrasjoner peptid i urin			Vann
	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	
Neurotensin	2,3 %	0,4 %	0 %	33,6 %
NT 1-8	8,1 %	11,8 %	8,5 %	8,3 %
NT 1-6	0 %	0 %	0 %	0,2 %

Ekstraksjonsutbyttene (tabell 6-5) for NT 1-8 viste seg å være minst like bra som i vann. Selv med lave konsentrasjoner av peptid tilsatt til urin var utbyttet over 8 % som tilsvarer en oppkonsentreringsfaktor på 5. En forklaring til at utbyttet er minst like bra som i vann, kan være en utsaltingseffekt i donorfase. Siden urin inneholder en del salter vil dette kunne redusere løseligheten av peptidene og gi en økt overgang til organisk fase. I tillegg er konsentrasjonen av peptid mindre i urinforsøkene enn eksperimentene i vann, noe som gjør til at mer ionpardanner blir tilgjengelig for hvert enkelt peptid og kan bidra til økt utbytte.

Selv om ekstraksjonsbetingelsene skulle være gunstige for neurotensin, var ekstraksjon fra urin ikke vellykket i dette forsøket. Flere forklaringer kan være sannsynlige. Urin inneholder flere stoffer som kan interferere med selve ekstraksjonen av neurotensin. En annen årsak kan være at urin inneholder enzymer som bryter ned neurotensin til blant annet NT 1-8. Det har tidligere blitt vist at inkubasjon av neurotensin med urin har gitt rask nedbrytning av neurotensin, noe som kan være en forklaring på manglende ekstraksjonsutbytte[41]. Visst neurotensin blir metabolisert til NT 1-8 kan dette også være en forklaring på det økte utbyttet av NT 1-8 i urin i forhold til vann. NT 1-6 ble heller ikke ekstrahert fra urin. Dette er ikke helt uventet da forsøkene i vann viste at peptidet ikke har egnede egenskaper til ekstraksjon i LPME-systemet. Urin er i motsetning til plasma en matriks som varierer mye i sammensetning avhengig av væskeinntak, når på døgnet prøven er tatt og personen prøven ble tatt av. Flere forsøk i forskjellige typer urin bør derfor gjøres for å bekrefte at metoden fungerer og for å opparbeide mer kunnskap om LPME av peptid i urin.

6.3 LC-MS

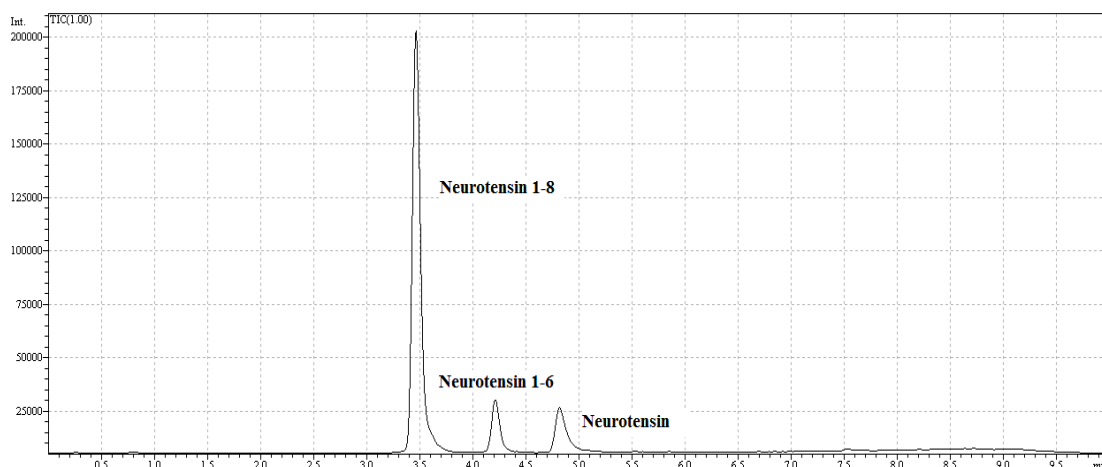
6.3.1 Metode for analyse av peptider

For å kunne forbedre følsomheten i analyse av peptider ble det bestemt å utvikle en metode med MS-deteksjon. Dette ville være et kraftig verktøy for å kunne detektere peptidene i biologiske væsker der konsentrasjonene er svært lave[15, 16]. Kolonnen som ble brukt var den samme som ble brukt til HPLC med UV-deteksjon og hadde dimensjonene 50×2 mm. Ved valg av mobilfase ble det tatt utgangspunkt i en allerede eksisterende metode for analyse av peptider[40]. Maursyre ble brukt i mobilfase A for å gi sur pH. Maursyre ble valgt fordi den er flyktig noe som er helt nødvendig når den skal gjennom MS. Av samme grunn kan ikke 1-heptansulfonsyre brukes som ionpardanner i mobilfasen da den ikke er flyktig. Peptidene har likevel nok retarderende egenskaper til å få retensjon på kolonnen. Grunnlinjeseparasjon er heller ikke nødvendig med MS-deteksjon siden analyttene i tillegg kan skilles med hensyn på m/z -verdier. Neurotensin 1-6 har 1 ladning og vil derfor få en m/z -verdi på $M+1$ etter protonering. Verdien av m/z blir beregnet ved å dele massen på ladningen til molekylet. NT 1-8 har 2 positive ladninger i surt miljø og vil kunne få 2 forskjellige m/z -verdier (se tabell 6-6) På samme måte har neurotensin 3 ladninger og vil dermed kunne få 3 forskjellige m/z -verdier. Etter å ha detektert i fullscan over et større masseområde (m/z fra 400 til 1700), ble m/z -verdiene med høyest intensitet for de enkelte peptidene brukt til å lage et program med selektiv ionemonitorering (SIM) for å øke følsomheten av deteksjonen.

Tabell 6-6 Molekylvekt til peptidene, m/z -verdier brukt i SIM (uthevet) og gjennomsnittlig retensjonstid.

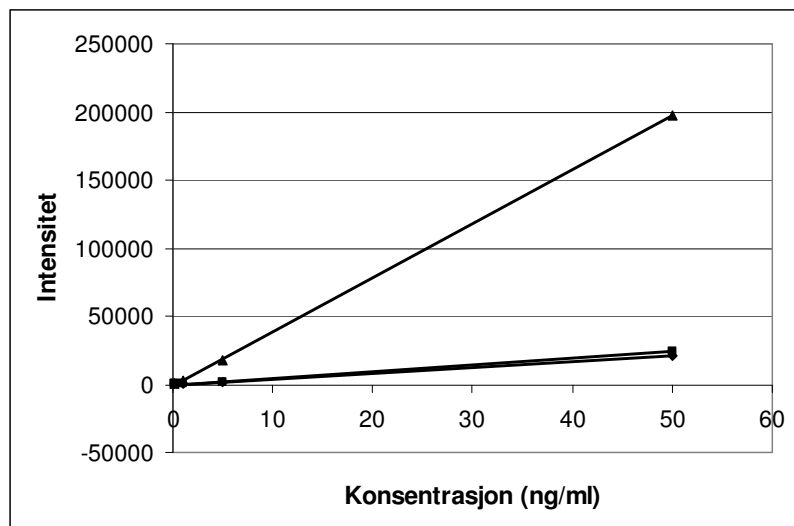
Peptid	Molekylvekt	m/z -verdier	Retensjonstid (min)
Neurotensin 1-8	1029	516,0 1030,0	3,47
Neurotensin	1672,9	558,3 837,5 1674	4,84
Neurotensin 1-6	776,85	777,5	4,21

Figur 6-21 viser et kromatogram fra analyse av de tre peptidene. Sammenlignet med tidligere analyser der UV-detektor ble brukt (se figur 6-1) er retensjonsrekkefølgen en annen. Dette kan forklares med en forandret mobilfase siden ionpardanneren (1-heptansulfonsyre) ikke kan brukes i mobilfase til LC-MS. Det betyr at peptidene ikke blir eluert som ionpar (som tidligere) og får dermed forandret affinitet for stasjonærfasen på kolonnen.



Figur 6-21 Figuren viser analyse av løsninger på 50 ng/ml av neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8 i LC-MS med metoden beskrevet i kapittel 5.7.

Siden denne metoden ikke var brukt på peptidene før, ble ulike konsentrasjoner av neurotensin, neurotensin 1-6 og neurotensin 1-8 analysert for å undersøke systemets respons. På grunnlag av dataene ble lineariteten til responsen av metoden undersøkt, samt en nedre deteksjonsgrense beregnet. Figur 6-22 viser kalibreringskurve for neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8.

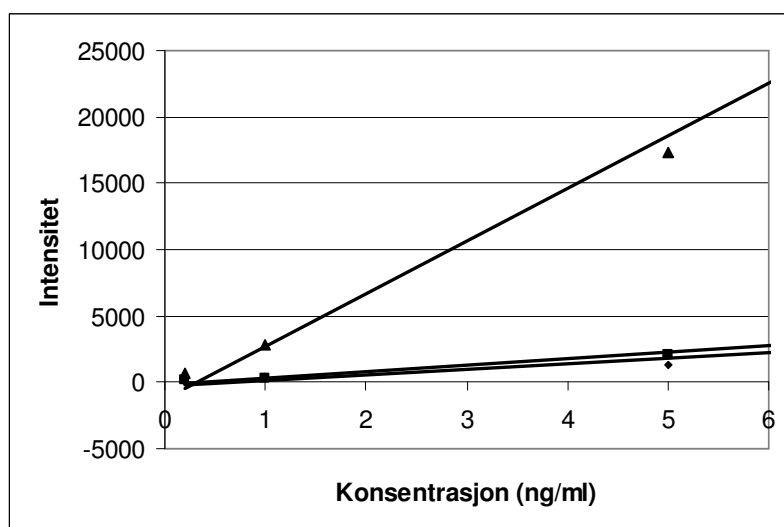


Figur 6-22 Kalibreringskurve for neurotensin (◆), NT 1-6 (■) og NT 1-8 (▲) i LC-MS,

Tabell 6-7 Regresjonskoeffisient og funksjon til de rette linjene for konsentrasjonskurvene til neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8.

Peptid	r^2	Funksjon
Neurotensin 1-8	0,999	$y=3966x-1243$
Neurotensin 1-6	0,999	$y=490x-177$
Neurotensin	0,999	$y=421x-272$

Det må understrekes at dette ikke er en fullstendig validering av metoden. I en fullstendig validering ville det vært nødvendig med flere konsentrasjoner av peptidene for å unngå for stor avstand mellom punktene. Som tabell 6-7 illustrerer, viser de innledende forsøkene viser en god linearitet. Selv om det siste punktet på 50 ng/ml får stor innvirkning på lineariteten, viser figur 6-23 at punktene i det nedre området ligger tett opp til den rette linjen trukket mellom punktene.



Figur 6-23 Utsnitt av det nedre konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven for neurotensin (♦), NT 1-8 (▲) NT 1-6 (■).

Med utgangspunkt i konsentrasjonsrekkene ble den nedre deteksjonsgrensen beregnet. Nedre deteksjonsgrense ble satt til et signal-støy forhold på 3 ($S/N=3$). Støyen ble målt ved å måle høyden på støyen i grunnlinjen i området der peptidene eluerte. Ved å bruke ligningen til kalibreringskurven for peptidene ble nedre deteksjonsgrense beregnet. Tabell 6-8 viser den nedre deteksjonsgrensen for peptidene både i konsentrasjon (cLOD) og masse (mLOD).

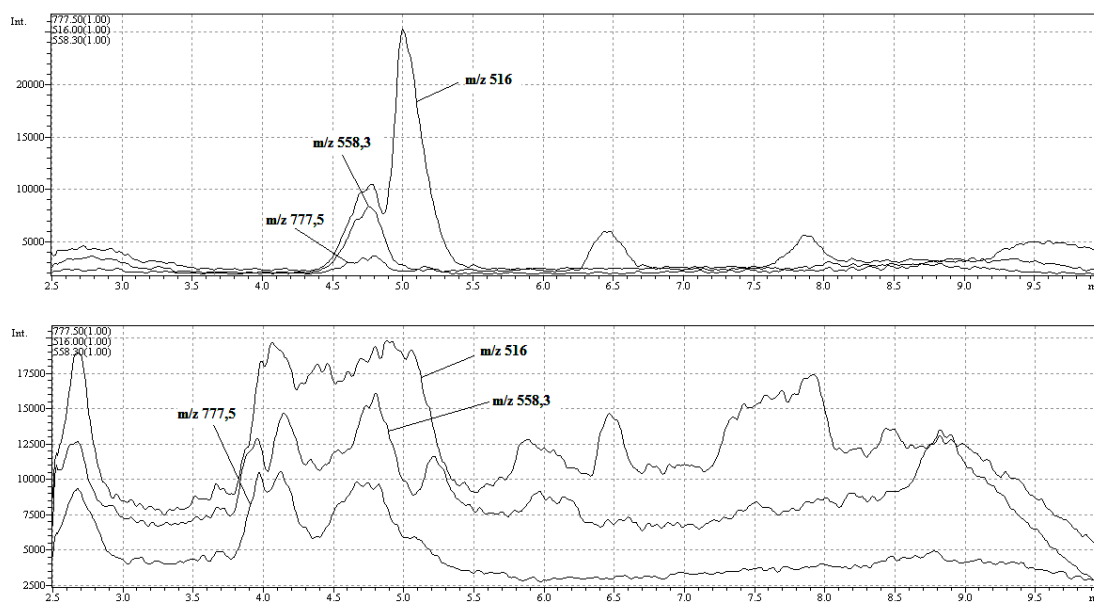
Tabell 6-8 Nedre deteksjonsgrense for neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8.

Peptid	cLOD	mLOD
Neurotensin 1-8	0,5 ng/ml	20 pg
Neurotensin 1-6	1,0 ng/ml	40 pg
Neurotensin	1,2 ng/ml	48 pg

Neurotensin 1-8 gir svært høye signaler ved MS-deteksjon og den nedre deteksjonsgrensen er mye lavere enn for neurotensin og neurotensin 1-6. Med flere konsentrasjonsrekker og tettere punkter vil sannsynligvis den beregnede nedre deteksjonsgrense kunne settes lavere for NT 1-8. Det kan da vises med signifikanstesting at kurven går gjennom origo og fastleddet i ligningen kan sløyfes. Dette samsvarer med det som er observert under analysene, der den nedre deteksjonsgrensen ser ut til å kunne ligge lavere for NT 1-8. I kombinasjon med LPME som kan gi høy oppkonsentrering vil det være mulig å detektere peptidene i langt lavere konsentrasjoner i for eksempel biologiske væsker, avhengig av oppkonsentreringsfaktoren. En annen observasjon som er gjort under forsøkene er at signalene fra neurotensin blir mindre og mindre når fortynningene står lagret en stund. Dette kan tyde på at neurotensin fester seg til glass, noe som vil være særlig lett å merke i så små konsentrasjoner. Men dette er imidlertid noe som må undersøkes nærmere.

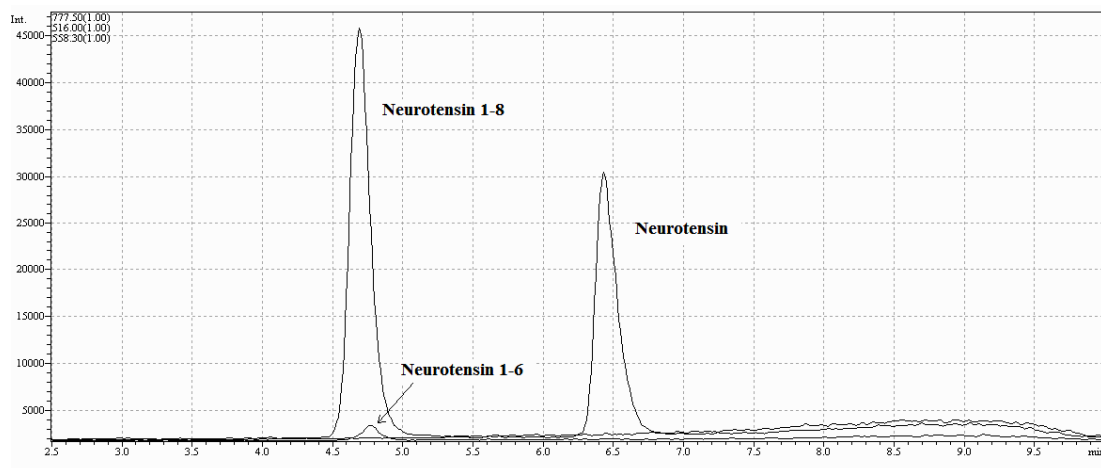
6.3.2 Prøveopparbeidelse (LPME) i vann og urin før analyse på LC-MS

For å kontrollere kompatibiliteten til LPME-metoden med LC-MS ble det utført ekstraksjoner både i vann og urin som ble analysert.

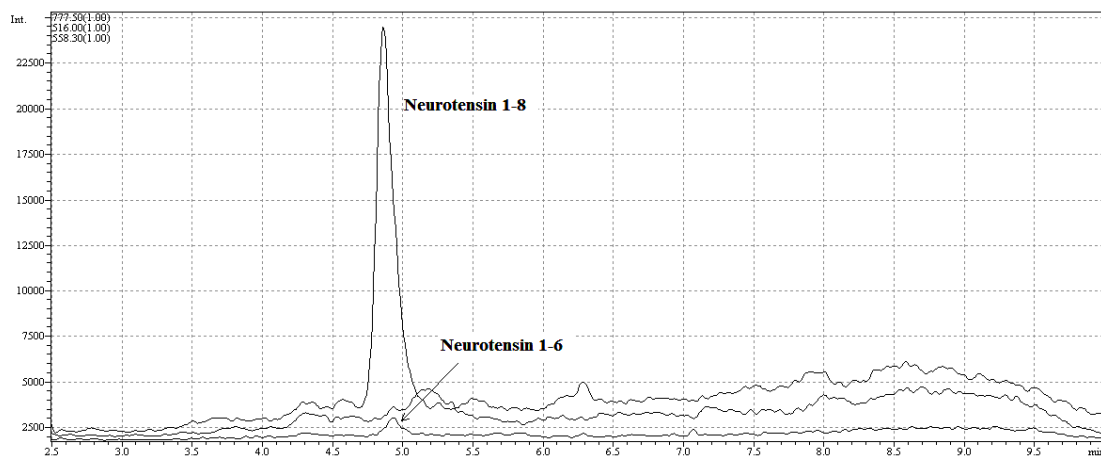


Figur 6-24 Kromatogrammene viser analyse med LC-MS av akseptorfasene etter LPME av vann (øverst) og urin (nederst).

Analysene viste at peptidene var blitt ekstrahert, men toppene i kromatogrammet var delte og eluerte i flere fraksjoner med ulike retensjonstider og var derfor ikke kvantifiserbare, noe som fremgår tydelig fra figur 6-24. Dette kan forklares med at noe av sulfonsyren går over i akseptorfasen ved ekstraksjon, noe som gir dannelse av komplekser mellom peptid og ionpardanner. Siden ionpardanner ikke blir brukt i mobilfasen vil bare noen av peptidmolekylene delta i komplekser og de får ulike retensjonstider avhengig av dette. For å gi en kvantifiserbar og reproducerbar analyse måtte enten all interaksjon mellom peptid og ionpardanner brytes, eller tilsetning av et stort overskudd av ionpardanner som gir komplekser med alle peptidmolekylene. Det ble valgt å prøve å fortynne akseptorfasen etter ekstraksjon med en ammoniumformiatbuffer pH 2,75. Denne fremgangsmåten gav enkle topper av peptidene og bekreftet at ekstraktene gav signal med MS-deteksjon som vist i figur 6-25 og 6-26. Retensjonstidene ble noe forskjøvet sammenlignet med vandige prøver. Dette kan ha sammenheng med substanser i ekstraktet fra LPME som kan påvirke retensjonen av peptidene.



Figur 6-25 Kromatogrammet viser analyse av akseptorfaser fortynnet med ammoniumformiatbuffer pH 2,75 etter LPME i vann.



Figur 6-26 Kromatogrammet viser analyse av akseptorfaser fortynnet med ammoniumformiatbuffer pH 2,75 etter LPME i urin.

Tilsetning av ammoniumformiatbuffer til akseptorfaser vil fortynne ionpaddannerkonsentrasjonen og føre til mindre interaksjon mellom peptid og ionpaddanner. I tillegg vil ammoniumionene kunne konkurrere med peptidene om binding til sulfonsyren. I tabell 6-9 følger en oversikt over ekstraksjonsutbyttene av de enkelte peptidene. Siden metoden ikke er validert og dette var testkjøringer har ekstraksjonsutbyttene en stor usikkerhet knyttet til seg.

Tabell 6-9 Tabellen viser overslag av ekstraksjonsutbyttene av peptidene etter LPME i vann og urin analysert i LC-MS.

Peptider	Ekstraksjonsutbytter	
	Vann	Urin
Neurotensin	50 %	0 %
Neurotensin 1-6	1 %	2 %
Neurotensin 1-8	9 %	13 %

Tabell 6-9 viser at verdiene av ekstraksjonsutbyttene er i størrelsesorden det samme som ved UV-deteksjon. Her ble det også observert at ekstraksjonsutbyttet av neurotensin gikk ifra svært godt i vann til ingenting i urin. Som nevnt tidligere (kapittel 6.2.4), kan dette ha flere årsaker, deriblant tilstedeværelse av enzymer i urin eller overflateaktive stoffer som interfererer med selve ekstraksjonen. Det ble også observert høyere ekstraksjonsutbytter av NT 1-8 i urin. Til dette kan det også være flere forklaringer. Siden urin inneholder mye salter, kan en utsaltingseffekt som fører til mindre løselighet i donorfasen tenkes. Metabolisme av neurotensin til NT 1-8 kan også være en årsak til høyere utbytte. En siste forklaring kan være at siden konsentrasjonen av peptidene var mindre i ekstraksjonene av urin, blir konsentrasjonen av ionpardanner større i forhold til peptid sammenlignet med ekstraksjoner i vann. Som vist tidligere (kapittel 6.2.1.1) har konsentrasjonen av ionpardanner innvirkning på ekstraksjonsutbyttet. Mer nøyaktige analyser bør utføres med en validert metode. Det bør også knyttes en del usikkerhet til ekstraksjonsutbyttene for neurotensin, da dette peptidet foreløpig har vist varierende resultater med denne analysemetoden i LC-MS. For at LC-MS skal bli et nyttig analyseverktøy i forbindelse med LPME av peptider, stiller det krav til at LC-metoden i systemet må optimaliseres for å være kompatibel med ekstraksjonsprosedyren og kunne dra nytte av den oppkonsentrering som LPME-systemet gir.

7 KONKLUSJON

Det har i denne oppgaven blitt utviklet en metode for selektiv prøveopparbeidelse av peptider. Modellpeptidene neurotensin, NT 1-6 og NT 1-8 har blitt ekstrahert ved hjelp av LPME. Til analyse av ekstraktene er det utviklet en HPLC-metode som gir god separasjon av peptidene.

Tilsetning av en ionpardanner til donorfasen viste seg å være helt nødvendig for å oppnå en vellykket ekstraksjon og hydrofile peptider ekstraheres best med hydrofobe ionpardannere. Forsøkene har vist at dannelse av et hydrofobt kompleks bestående av ionpardanner og peptid er viktig for å krysse den organiske membranen. Det har vist seg at ekstraksjon av hydrofobe analytter er lettere og gir bedre utbytter enn ekstraksjon av analytter som er mindre hydrofobe. NT 1-6 er sannsynligvis for hydrofil til at den vil være mulig å ekstrahere over den organiske fasen i særlig grad. Metoden er svært pH-avhengig og det ser ut til at det er viktig med et overskudd av protoner i akseptorfasen i forhold til i donorfasen for at ekstraksjonen skal kunne gi utbytte. Fortrenging av peptidet fra ionpardanneren i grenseflaten mellom organisk fase og akseptorfase er en viktig faktor for å få et høyt ekstraksjonsutbytte. Dette bekreftes av det økte utbyttet som ble observert ved tilsetning av positive ioner til akseptorfasen. Ekstraksjonsutbytter på 57 % og 8 % ble oppnådd for henholdsvis Neurotensin og NT 1-8 noe som tilsvarer oppkonsentreringsfaktorer på 28 for neurotensin og 4 for NT 1-8.

En LC-MS metode ble utviklet for å gi bedre følsomhet med tanke på deteksjon i biologiske væsker. Nedre deteksjonsgrense ligger foreløpig i lavt ng/ml nivå (NT 1-6 og neurotensin) og øvre pg/ml nivå (NT 1-8). Med en god oppkonsentreringsfaktor fra LPME-ekstraksjonen kan denne deteksjonsgrensen reduseres betraktelig. Ekstraksjon av urin ble gjennomført der NT 1-8 ble ekstrahert over, men lite neurotensin og NT 1-6. Flere årsaker kan tenkes til at neurotensin ikke blir ekstrahert i urin, deriblant enzymatisk nedbrytning av neurotensin til blant annet NT 1-8. Dette må imidlertid eventuelt bekreftes med andre eksperimenter.

Med så mange ulike variable i et system, ville man sannsynligvis være tjent med å utføre en statistisk forsøksplanlegging før forsøkene startet. Dette ville ført til enda bedre struktur og en del tidsbesparelse. Med tanke på videre forskning er det flere veier å gå. Nærmere studier av LPME i biologiske væsker er nok en retning som bør prioriteres. Dette inkluderer forsøker i plasma der proteiner, høy pH og bufferkapasitet vil påvirke ekstraksjonen. Mer basale eksperimenter som kan gi svar på mekanismer i ekstraksjonen av peptider vil også være

nødvendig. Eksperimenter i basisk miljø med en ionpardanner som er positivt ladet vil være et aktuelt område. Det bør være et minst like stort potensial i å utnytte de negative ladningene på peptidene til å danne ionpar. Dette gjelder særlig for NT 1-6 og NT 1-8 som kan ha inntil 3 negative ladninger ved basisk pH. I tillegg bør andre endogene peptider forsøkes ekstrahert ved hjelp av LPME for å se om oppsettet vil kunne fungere på flere substanser. LC-delen i LC-MS bør optimaliseres til å bli mer kompatibel med prøveopparbeidelsen. Siden 1-heptansulfonsyre ikke kan brukes i mobilfase, bør det utvikles en robust metode for behandling av ekstraktene fra prøveopparbeidelse til analyse som ivaretar oppkonsentreringen fra prøveopparbeidelsen. LPME i kombinasjon med LC-MS vil da kunne bli et kraftig verktøy til å kunne analysere peptider som for eksempel biomarkører ved patologiske tilstander hos pasienter eller utføre serumkonsentrasjonsmålinger av peptider som legemidler.

8 REFERANSELISTE

1. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*. 2nd edition ed. 1993: Worth Publishers.
2. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
3. Andersen, S., et al., *Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices*. Journal of Chromatography A, 2002. **963**(1-2): p. 303-312.
4. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions*. Analyst, 2002. **127**(5): p. 608-613.
5. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction - Comparison with conventional liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2002. **963**(1-2): p. 3-17.
6. Valle Paulsen, J., *Væske-fase mikroekstraksjon av små modell peptider i surt miljø*. 2003, Universitetet i Oslo.
7. Carraway, R. and S.E. Leeman, *Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, from Bovine Hypothalami*. Journal of Biological Chemistry, 1973. **248**(19): p. 6854-6861.
8. Hermans, E. and J.M. Maloteaux, *Mechanisms of regulation of neurotensin receptors*. Pharmacology & Therapeutics, 1998. **79**(2): p. 89-104.
9. Shulkes, A., D.R. Fletcher, and K.J. Hardy, *Organ and Plasma Metabolism of Neurotensin in Sheep*. American Journal of Physiology, 1983. **245**(5): p. E457-E462.
10. Brook, C.W., et al., *Hepatic-Metabolism of Neurotensin*. Endocrinology, 1987. **120**(4): p. 1397-1402.
11. Gillatt, D.J., et al., *Metabolism of Neurotensin by Isolated Perfused Rat-Kidney*. American Journal of Physiology, 1990. **258**(6): p. E930-E936.
12. Shulkes, A., et al., *Metabolism of Neurotensin and Pancreatic-Polypeptide in Man - Role of the Kidney and Plasma Factors*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1984. **58**(5): p. 873-879.
13. Ferris, C.F., et al., *Plasma-Levels of Human Neurotensin - Methodological and Physiological Considerations*. Peptides, 1991. **12**(2): p. 215-220.

14. Bozzola, M., et al., *Plasma neurotensin levels in prepubertal children and adults: Possible involvement in the regulation of growth hormone secretion*. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 1998. **11**(5): p. 615-621.
15. Schimpff, R.M., et al., *Increased plasma neurotensin concentrations in patients with Parkinson's disease*. Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry, 2001. **70**(6): p. 784-786.
16. Bardella, M.T., et al., *Gastric emptying and plasma neurotensin levels in untreated celiac patients*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2000. **35**(3): p. 269-273.
17. Causon, R.C. and R.D. McDowall, *Sample Pretreatment Techniques for the Bioanalysis of Peptides*. Journal of Controlled Release, 1992. **21**(1-3): p. 37-48.
18. Herraiz, T. and V. Casal, *Evaluation of Solid-Phase Extraction Procedures in Peptide Analysis*. Journal of Chromatography A, 1995. **708**(2): p. 209-221.
19. Herraiz, T., *Sample preparation and reversed phase-high performance liquid chromatography analysis of food-derived peptides*. Analytica Chimica Acta, 1997. **352**(1-3): p. 119-139.
20. Drapala, A., et al., *Supported liquid membrane extraction of peptides*. Acta Biochimica Polonica, 2001. **48**(4): p. 1113-1116.
21. Liu, X.R. and D.S. Liu, *Modeling of facilitated transport of phenylalanine by emulsion liquid membranes with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid as a carrier*. Separation Science and Technology, 1998. **33**(16): p. 2597-2608.
22. Juang, R.S. and Y.Y. Wang, *Amino acid separation with D2EHPA by solvent extraction and liquid surfactant membranes*. Journal of Membrane Science, 2002. **207**(2): p. 241-252.
23. Choi, J.W., et al., *Separation and concentration of L-phenylalanine using hollow fiber supported liquid membrane*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2003. **9**(3): p. 294-300.
24. Barboiu, M., et al., *A new alternative to amino acids transport: facilitated transport of L-phenylalanine by hybrid siloxane membranes containing a fixed site macrocyclic complexant*. Journal of Membrane Science, 1999. **161**(1-2): p. 193-206.
25. Buschmann, H., L. Mutihac, and R. Mutihac, *Physiochemical Parameters of the Transport of Amines and Amino Acids through Liquid Membranes by Macrocyclic Ligands*. Separation Science and Technology, 1999. **34**(2): p. 331-341.

26. Barboiu, M., et al., *Facilitated transport of organics of biological interest I. A new alternative for the separation of amino acids by fixed-site crown-ether polysiloxane membranes*. Journal of Membrane Science, 2000. **172**(1-2): p. 91-103.
27. Ersoz, M., et al., *Transport Studies of Amino-Acids through a Liquid Membrane System Containing Carboxylated Poly(Styrene) Carrier*. Journal of Membrane Science, 1995. **104**(3): p. 263-269.
28. Oshima, T., et al., *Liquid membrane transport of amino acids by a calix 6 arene carboxylic acid derivative*. Journal of Membrane Science, 2003. **217**(1-2): p. 87-97.
29. Metayer, M., et al., *Facilitated transport of alpha-alanine and phenylalanine through sulfonic cation-exchange membranes*. Desalination, 2002. **147**(1-3): p. 375-380.
30. Buschmann, H.J. and L. Mutihac, *Complexation, liquid-liquid extraction, and transport through a liquid membrane of protonated peptides using crown ethers*. Analytica Chimica Acta, 2002. **466**(1): p. 101-108.
31. Drapala, A. and P. Wiczorek, *Extraction of short peptides using supported liquid membranes*. Desalination, 2002. **148**(1-3): p. 235-239.
32. Pedersen-Bjergaard, S., T.S. Ho, and K.E. Rasmussen, *Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs*. Journal of Separation Science, 2002. **25**(3): p. 141-146.
33. Dzygiel, P. and P. Wiczorek, *Extraction of glyphosate by a supported liquid membrane technique*. Journal of Chromatography A, 2000. **889**(1-2): p. 93-98.
34. Ho, T.S., et al., *Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport*. Journal of Chromatography A, 2003. **998**(1-2): p. 61-72.
35. Ugland, H.G., M. Krogh, and L. Reubsæet, *Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2003. **798**(1): p. 127-135.
36. Advanced Chemistry Development Inc., *ACD/ChemSketch v. 5.11*: Toronto, Canada.
37. Vanderbilt Medical Center, *Mass Spectrometry Research Center*. 2004, <http://staging.mc.vanderbilt.edu/msrc/tutorials/ms/fig5.htm>.
38. *The Merck Index Thirteenth Edition*. 2001.
39. Hansch, C., A. Leo, and D. Hoekman, *Exploring QSAR*. 1995.
40. Yi, E.C., et al., *A microcapillary trap cartridge-microcapillary high-performance liquid chromatography electrospray ionization emitter device capable of peptide tandem mass spectrometry at the attomole level on an ion trap mass spectrometer with*

- automated routine operation*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(18): p. 2093-2098.
41. Bjerke, T., E.I. Christensen, and N. Boye, *Tubular Handling of Neurotensin in the Rat-Kidney as Studied by Micropuncture and Hplc*. American Journal of Physiology, 1989. **256**(1): p. F100-F106.